

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Direktor: Herr Prof. Dr. med. h. c. Thomas Zahnert

**Eine histologische Charakterisierung des menschlichen
olfaktorischen Riechepithels sowie des olfaktorischen
Bulbus mit einem Fokus auf altersabhängige Unterschiede**

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Mira Pauline Fitzek

aus Erlangen

Dresden, 2023

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Th. Hummel

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Vorsitzender/e der Promotionskommission

Monografie

Für meine Eltern

VERÖFFENTLICHTES MANUSKRIFT:

Die folgende Arbeit wurde im Journal of Comparative Neurology (2022) publiziert:

Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E., & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. Journal of Comparative Neurology, 1–22.

Eigenanteil und weitere Beteiligte dieses Projektes:

Konzeptualisierung: James E. Schwob, Eric H. Holbrook und Mira Fitzek

Probengewinnung: Eric H. Holbrook

Histologie und Visualisierung der Epithelschnitte (Bulbi olfactorii & Riechepithel): Mira Fitzek

Histologie und Visualisierung gesamte Schleimhautblätter: Eric H. Holbrook, Peter D. Solomon

Datenanalyse Epithelschnitte: Mira Fitzek

Datenanalyse gesamte Schleimhautblätter: Mira Fitzek, Parthkumar K. Patel, Brian Lin und Eric H. Holbrook

Einwerben von Finanzierungsmitteln: James E. Schwob.

Überarbeitung und Ergänzung des Manuskripts: alle Autoren

Poster-Präsentation: ACHEMS, 2018, Florida

Vortrag: HNO-Kongress, 2023, Leipzig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einführung in die Thematik.....	1
1.1 Der menschliche Geruchssinn und seine evolutionäre Bedeutung	1
1.2 Eine Einführung in die Geruchswahrnehmung anhand ihrer grundlegenden anatomischen Strukturen	1
1.2.1 Die Detektion der Duftstoffe im olfaktorischen Epithel.....	1
1.2.2 Die Projektion aus dem olfaktorischen Epithel in den olfaktorischen Bulbus	2
1.2.3 Die sekundäre zentrale Geruchsverarbeitung	4
1.3 Der histologische Aufbau des Geruchssystems	6
1.3.1 Der histologische Aufbau des olfaktorischen Epithels	6
1.3.2 Der histologische Aufbau des olfaktorischen Bulbus.....	8
1.4 Veränderungen des olfaktorischen Epithels und des olfaktorischen Bulbus im Alter.....	10
1.4.1 Die histopathologischen Veränderungen des olfaktorischen Epithels im Alter	11
1.4.2 Die histopathologische Veränderungen des olfaktorischen Bulbus im Alter	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	12
1.6 Hypothesen.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes.....	16
2.2 Immunhistochemische Analyse.....	19

2.2.1 Grundlagen der Immunhistochemie	19
2.2.1.1 Fixierung und Antigen-Rückgewinnung.....	19
2.2.1.2 Allgemeine Immunfluoreszenz-Färbung.....	20
2.2.1.3 Möglichkeiten der Signalverstärkung.....	20
2.2.2 Färbung der Gewebeschnitte des Riechepithels und des Bulbus olfactorius.....	22
2.2.3 Färbung der gesamten Schleimhautblätter.....	23
2.3 Mikroskopie.....	28
2.4 Quantitative Analyse ganzer Schleimhautblätter.....	28
2.5 Quantitative Analyse der Gewebeschnitte des OEs und OBs.....	30
2.5.1 Gewebeschnitte des olfaktorischen Epithels.....	31
2.5.1.1 Ausmaß des neuronalen Reifegrades und Quantifizierung von Neuromen.....	32
2.5.1.2 Gesundheitszustand des neuronalen Epithels, des respiratorischen Epithels und subepitheliale Zysten.....	32
2.5.1.3 Epitheliale Regenerationsfähigkeit.....	33
2.5.2 Gewebeschnitte der olfaktorischen Bulbi.....	33
2.5.2.1 Bulbuslänge und -volumen.....	33
2.5.2.2 Quantifizierung der Glomeruli	34
2.6 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Das olfaktorische Epithel	39
3.1.1 Die anatomische Lage des olfaktorischen Epithels	39
3.1.2 Veränderungen des olfaktorischen Epithels in Abhängigkeit vom Alter	39
3.1.3 Verschiebungen der neuronalen Dichte innerhalb des olfaktorischen Epithels in Abhängigkeit vom Alter	42
3.1.4 Charakterisierung des olfaktorischen Epithels	44

3.1.4.1 Qualitative Analyse des menschlichen Riechepithels im Vergleich zum Embryo.....	44
3.1.4.2 Verfassung des OEs in Abhängigkeit von Alter und Demenz..	45
3.1.4.3 Regenerationsaktivität in Abhängigkeit von Alter und Demenz.....	46
3.1.4.4 Submukosale Zysten mit epithelialer Auskleidung.....	47
3.1.4.5 Epitheliale Neurome.....	49
3.2 Der Bulbus olfactorius.....	51
3.2.1 OB-Dimension in Abhängigkeit von Alter und Demenz	51
3.2.2 Qualitative Analyse des olfaktorischen Bulbus.....	51
3.2.3 Quantifizierung der Glomeruli.....	52
3.3. Intraindividuelle Korrelationen zwischen OE und OB	53
3 Diskussion und Ausblick	56
3.1 Das olfaktorische Epithel des Menschen	56
3.1.1 Der makroskopische Aufbau des olfaktorischen Epithels und seine Veränderungen über die Lebensspanne	56
3.1.2 Der mikroskopische Aufbau des olfaktorischen Epithels und seine Veränderungen über die Lebensspanne	58
3.1.2.1 Der Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone und Ersatz mit respiratorischer Metaplasie	58
3.1.2.2 Hypothesen zu zugrundeliegenden Ursachen der beobachteten Degeneration des olfaktorischen Epithels im Alter.....	60
3.1.2.3 Submuköse Zysten	62
3.1.2.4 Neurome	63
3.2 Der olfaktorische Bulbus des Menschen und die Projektion aus der olfaktorischen Peripherie in den olfaktorischen Bulbus.....	64
3.2.1 Der makro- und mikroskopischen Aufbau des olfaktorischen Bulbus und seine Veränderungen im Laufe des Lebens	64

3.2.1.1 Qualitative Veränderungen der Glomerulären- und Mitralzellschicht im Alter – ektope Glomeruli	64
3.2.1.2 Quantitative Veränderungen der glomerulären Zellschicht im Alter und die Korrelation des neurogenen Status des olfaktorischen Epithels mit dem neurogenen Status des olfaktorischen Bulbus	66
3.3 Die histopathologischen Veränderungen des olfaktorischen Epithels und olfaktorischen Bulbus bei demenziellen Erkrankungen.....	69
4 Limitationen	70
5 Zusammenfassung	71
Hintergrund.....	71
Material und Methoden	71
Ergebnisse.....	72
Schlussfolgerungen.....	72
6 Summary	74
Background	74
Materials and Methods.....	74
Results	75
Conclusion.....	75
7 Literaturverzeichnis.....	76
Anlage 1	94
Anlage 2	95
Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex – Avidin-Biotin-Fluorphen/Enzym Komplex

ABR – Advanced Bioscience Resources Inc.

AGR – Anatomy Gifts Registry

BetaIV – β -Tubulin IV

BSA – Rinderserumalbumin

DAB – 3,3'-Diaminobenzidin

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

FITC -Tryramid – Fluoreszenzmarkiertes Tyramid

GABA - γ -Aminobuttersäure

GBZ – Globale Basalzellen

HBZ – Horizontale Basalzellen

HIER – Hitze-induzierte Epitop Rückgewinnung

HRP – Horseradish Peroxidase

H₂O₂ – Wasserstoffperoxid

IF-Färbung – Immunfluoreszenzfärbung

NDRI – National Disease Research Interchange

NFDM – Non-Fat Dry Milk

NDB – Normal Donkeyblock

OB – Olfaktorischer Bulbus

OCT – Optimal Cutting Temperature

OE – Olfaktorisches Epithel

OMP – Olfaktorisches Marker Protein

PBS – Phosphat gepufferter Kochsalzlösung

PIER – Protease-induzierte Epitop Rückgewinnung

SEM – Standardfehler des Mittelwerts

SA-HRP – Streptavidin-Horseradish Peroxidase

Sox2 – Transkriptionsfaktor Sex Determining Region Y-Box 2

Tbx21 – Transkriptionsfaktor T-Bet 21

TH – Tyrosin Hydroxylase

TNB – Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TSA – Tyramid verstärkte Avidin-Biotin-Komplex-Methode

TUJ1 – Anti-Beta-III-Tubulin

VGlut2 – Vesikulärer Gutamatttransporter 2

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Färbebedingungen.....	25-27
Tabelle 2	Autopsiespender:innen.....	36-38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der Ablauf der Geruchswahrnehmung anhand ihrer grundlegenden anatomischen Strukturen.....	5
Abbildung 2	Die laminäre Organisation des Bulbus olfactorius in sechs konzentrischen Schichten.....	10
Abbildung 3	Aufbereitung der olfaktorischen Bulbi und Riechepithelien.....	18
Abbildung 4	Schematische Darstellung verschiedener Färbemethoden und Möglichkeiten der Signalverstärkung.....	21-22
Abbildung 5	Berechnung der Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts.....	30
Abbildung 6	Überblick über die erfolgten Analysen und hierfür verwendeten Autopsieproben für den OB und des OEs.....	31
Abbildung 7	Anatomische Lage des menschlichen OE und Veränderungen im Alter	41-42
Abbildung 8	Die Verteilung der neuronale Dichte innerhalb des adulten OEs....	43-44
Abbildung 9	Histologische Analyse des OEs und seinen Veränderungen im Alter an Epithelschnitten.....	47-48
Abbildung 10	Histologische Charakteristika des adulten OEs – Zysten und Neurome	50-51
Abbildung 11	Histologische Analyse des OBs und seinen Veränderungen im Alter an Epithelschnitten.....	54-55

1 Einführung in die Thematik

1.1 Der menschliche Geruchssinn und seine evolutionäre Bedeutung

Zur Wahrnehmung seiner Umwelt verfügt der Mensch über die fünf Sinne Riechen, Hören, Schmecken, Tasten und Sehen. Der phylogenetisch älteste dieser fünf Sinne ist der Geruchssinn. Bereits die ersten primitiven Wasserlebewesen konnten über im Wasser gelöste Geruchsstoffe Geruchsreize wahrnehmen (Taniguchi & Taniguchi, 2014).

Entgegen der gängigen Annahme besitzt der Mensch im Vergleich zu anderen Säugetieren keinen schlechten Geruchssinn. Tatsächlich kann er eine außergewöhnliche große Bandbreite an Gerüchen erkennen und ist für einige Düfte sogar empfindlicher als Nagetiere oder Hunde (McGann, 2017). So ist der Geruchssinn des Menschen in der Lage, innerhalb von Millisekunden mehrere Tausend Geruchsstoffe wahrzunehmen, zu unterscheiden und zu interpretieren, selbst wenn diese hinsichtlich ihrer chemischen Struktur häufig nur geringfügig voneinander abweichen (Laska & Hübener, 2001; Hatt, 2004; Bushdid et al., 2014). Damit ermöglicht er Individuen, in Kontakt mit ihrer Umwelt zu treten und spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben, indem er vor Gefahren wie Feuer oder verdorbenen Lebensmitteln warnt. Er dient darüber hinaus der Navigation (Raithel & Gottfried, 2021) und leitet den Weg zu potenziellen Paarungspartnern (Johansson & Jones, 2007), übernimmt eine komplexe Funktion bei der Modulation von Stimmungslagen und Emotionen und beeinflusst so zwischenmenschliche Interaktionen sowie das soziale Zusammenleben (Blomkvist & Hofer, 2021). Nicht zuletzt kann die Wahrnehmung von Gerüchen Erinnerungen an Objekte oder Ereignisse wecken und moduliert kognitive Funktionen wie Gedächtnisprozesse (Yahiaoui-Doktor et al., 2019; Uchida et al., 2020).

1.2 Eine Einführung in die Geruchswahrnehmung anhand ihrer grundlegenden anatomischen Strukturen

1.2.1 Die Detektion der Duftstoffe im olfaktorischen Epithel

Am Anfang einer jeden Geruchswahrnehmung steht ein Geruchsstoff. Geruchsstoffe sind flüchtige, größtenteils hydrophobe organische Verbindungen, die häufig in nur als wenige parts per trillion (ppt) vorliegen (Breer, 2003; Sharma et al., 2019). Die Wahrnehmung kleinster Konzentrationen dieser flüchtigen Verbindungen erfolgt beim Menschen wie auch bei allen anderen Säugetieren sowie Amphibien, Reptilien und Vögeln über eine spezifische anatomische Struktur, das olfaktorische Epithel (OE) (Taniguchi & Taniguchi, 2014).

Das OE bezeichnet den die Nase auskleidenden Teil der Schleimhaut, der zur Geruchswahrnehmung fähig ist. Es befindet sich in der oberen Nasenhöhle unterhalb der Lamina cribrosa der Siebbeinplatte, und bedeckt die obere Nasenscheidewand sowie die mittleren und oberen Nasenmuscheln (Moran et al., 1982; Leopold et al., 2000; Hadley et al., 2004; Kondo et al., 2020). Während das OE im Menschen nur etwa 3-5 % der gesamten Schleimhaut der Nase ausmacht, nimmt es bei Nagetieren wie der Maus bis zu 50 % der nasalen Mukosa ein (Holbrook et al., 2011; Salazar et al., 2019). Der übrige Teil der Nase wird von respiratorischem Epithel überzogen. Dieses dient neben dem Anfeuchten der Atemluft, der mukuziliären Clearance, also der Selbstreinigung und Infektabwehr der Atemwege (Gudis & Cohen, 2010; Ma et al., 2018), ist jedoch nicht zur Geruchswahrnehmung fähig.

Als am weitesten peripher gelegenen Teil des Geruchssinns beinhaltet das OE zur Geruchswahrnehmung olfaktorische Rezeptorneurone. Diese exprimieren auf ihren Zilien G-Protein-gekoppelte olfaktorische Rezeptoren, welche die Zellmembran mit sieben Transmembrandomänen durchziehen (Jones & Reed, 1989; Buck & Axel, 1991; Mombaerts, 1999) und spezifische Geruchsstoffe binden können (Buck & Axel, 1991; Maresh et al., 2008). Olfaktorische Rezeptorneurone der Maus exprimieren stets nur einen spezifischen olfaktorischen Rezeptor (Mombaerts, 1999; Ishii et al., 2001). Studien an menschlichen Präparaten suggerieren ein vergleichbares Expressionsmuster (Durante et al., 2020; Patel et al., 2022).

Die Wahrnehmung von Gerüchen beginnt mit der Bindung einzelner Geruchsstoffe an die olfaktorischen Rezeptoren der olfaktorischen Rezeptorneurone (Durante et al., 2020; Patel et al., 2022) (**Abbildung 1**). Dabei kann ein Geruchsmolekül verschiedene olfaktorische Rezeptoren aktivieren (Glusman et al., 2001). Ebenso kann ein olfaktorischer Rezeptor aber auch durch unterschiedliche Geruchsmoleküle aktiviert werden (Araneda et al., 2000; Kondo et al., 2020). Das dadurch entstehende komplexe Zusammenspiel zwischen Geruchsstoffen und olfaktorischen Rezeptoren ermöglicht schließlich die Detektion mehrerer Tausend unterschiedlicher Düfte (Laska & Hübener, 2001; Hatt, 2004; Bushdid et al., 2014).

Beim Menschen kodieren etwa 400 Gene „intakte“ olfaktorische Rezeptorproteine, wobei bisher nur für einen Bruchteil die entsprechenden Liganden (Geruchsstoffe) identifiziert werden konnten (Malnic, 2007; Valle-Leija, 2015; Glezer & Malnic, 2019). Mäuse besitzen im Vergleich etwa 1000 Gene und damit etwa 2,5-mal mehr als die Menschen (Godfrey et al., 2004; Nei et al., 2008).

1.2.2 Die Projektion aus dem olfaktorischen Epithel in den olfaktorischen Bulbus

Nach Detektion eines spezifischen Geruchsstoffs wird das Geruchssignal zur anschließenden zerebralen Geruchsverarbeitung vom primären Sinnesepithel, dem OE, zu zentralen

Strukturen weitergeleitet. Die wichtigste anatomische Struktur zur Weiterleitung, Verarbeitung und Integration des peripheren Geruchssignals ist der olfaktorische Bulbus (OB) (Mori et al., 1999). Dieser liegt unmittelbar kranial der Lamina cribrosa und kaudal des orbitofrontalen Kortex (Treloar et al., 2002; Richard et al., 2010; Hummel et al., 2017; Salazar et al., 2019). Er besteht aus sechs konzentrischen Schichten (Richard et al., 2010) und ist Teil des zentralen Nervensystems (**Abbildung 2**).

Einen grundlegenden Bestandteil des OBs bilden die Glomeruli. Ein Glomerulus beschreibt eine funktionelle Einheit der Geruchsverarbeitung und ist der Ort der Erregungsübertragung zwischen dem ersten und zweiten Neuron der Riechbahn (Kauer & Cinelli, 1993; Mori et al., 1999). Damit stellt er die erste Schaltstelle zwischen dem primären Sinnesepithel (OE) und den kortikalen Hirnarealen der Geruchsverarbeitung dar, wie im Folgenden im Detail erläutert wird.

Nach der Bindung eines Geruchsstoffes an ein primäres olfaktorisches Rezeptorneuron im OE, projizieren marklose Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone in Bündeln, den sogenannten Fila olfactoria, von ca. 200 Axonen als N. Olfactorius (1. Hirnnerv) durch die Lamina cribrosa (Siebbeinplatte) zu den Glomeruli des OB (Imamura et al., 2020) (Abbildung 1). In Nagetieren erfolgt die axonale Projektion aus dem OE in die Glomeruli des OBs rezeptotopisch, also entsprechend der Aminosäuresequenz der, auf den olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimierten, olfaktorischen Rezeptoren (Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994; Mombaerts et al., 1996; D.-J. Zou et al., 2004; Feinstein & Mombaerts, 2004). Dabei projizieren Axone derselben Gruppe, also Axone der Neurone mit gleichem olfaktorischen Rezeptor, selektiv in ein bis zwei Glomeruli (Mori et al., 2000; Potter et al., 2001; Maresh et al., 2008; Richard et al., 2010). In Mäusen sind diese Glomeruli interindividuell in ähnlichen Bereichen des Bulbus lokalisiert, was auf eine geruchsspezifische räumliche Verteilung innerhalb des Bulbus hindeutet (Baier & Korsching, 1994; Zapiec & Mombaerts, 2015). Inwieweit diese Art der olfaktorischen Projektion aus dem OE in die Glomeruli des OBs auf den Menschen übertragen werden kann, ist unklar. Erste Studien hinsichtlich der Anzahl menschlicher Glomeruli deuten aber darauf hin, dass sich die axonale Vernetzung zwischen dem primären Sinnesepithel und den sekundären Projektionsneuronen im Menschen möglicherweise grundlegend von der der Maus unterscheidet (Maresh et al., 2008). Bei einer geschätzten Anzahl von 5500 menschlichen Glomeruli auf ca. 350 funktionelle olfaktorische Rezeptoren läge das Verhältnis von Glomeruli pro olfaktorischen Rezeptor beim Menschen bei etwa 16:1 und nicht, wie bei Nagetieren, bei 2:1 (Maresh et al., 2008).

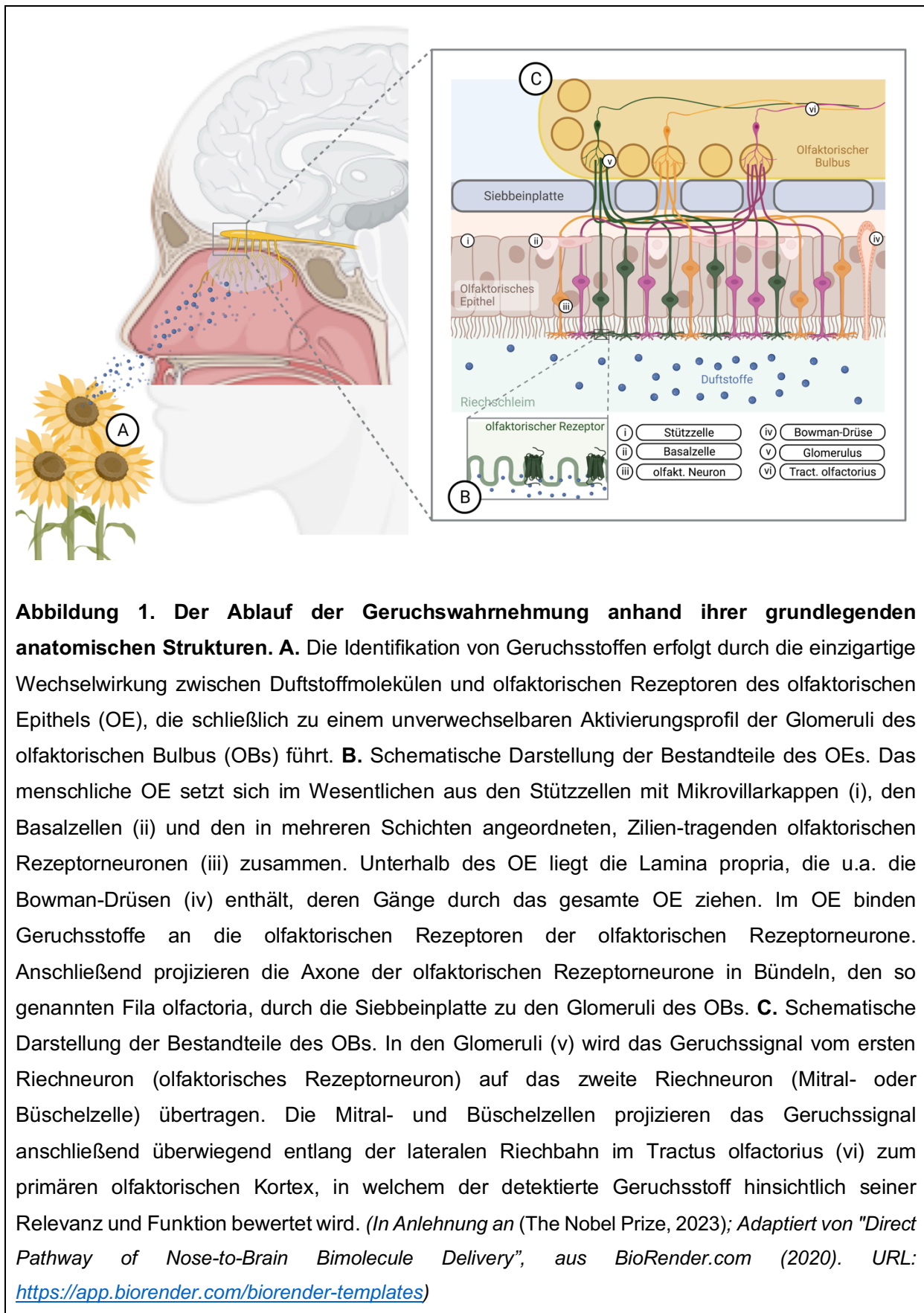
Die Identifikation von Geruchsstoffen in Säugetieren resultiert also aus der einzigartigen Abfolge unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen Geruchsstoffmolekülen und olfaktorischen Rezeptoren, die schließlich zu einem unverwechselbaren Aktivierungsprofil der

Glomeruli des OBs führen. Verschiedene Geruchsstoffe erzeugen dabei unterschiedliche glomeruläre Aktivierungsmuster und erlauben somit die Diskrimination unterschiedlicher Düfte, selbst wenn sich diese nur marginal voneinander unterscheiden (Price, 1973). Aus diesem Grund wird der OB auch als Ort der Identitätskodierung der Geruchsstoffe bezeichnet.

Innerhalb der Glomeruli bilden die olfaktorischen Rezeptorneurone (erstes Riechneuron) glutamaterge Synapsen mit sekundären Sinneszellen (zweites Riechneuron), den Mitralzellen und Büschelzellen aus (Buck & Axel, 1991; Shepherd & Shepherd, 2004). Diese projizieren das Geruchssignal anschließend überwiegend in Strukturen außerhalb des Bulbus, allen voran den olfaktorischen Kortex (Shepherd & Shepherd, 2004). Mitral- und Büschelzellen unterscheiden sich in der Lage ihrer dendritischen Synapsen und hinsichtlich ihrer Antwortmuster bei der Weiterleitung olfaktorischer Signale (Orona et al., 1984; Nagayama et al., 2004). Neben Synapsen zu sekundären Sinneszellen bilden die olfaktorischen Rezeptorneurone innerhalb der Glomeruli zusätzlich überwiegend GABAerge synaptische Verbindungen mit Interneuronen aus, welche die Übertragung von Geruchssignalen vor der Weiterleitung zu kortikalen Strukturen modulieren (Buck & Axel, 1991; Patel et al., 2022).

1.2.3 Die sekundäre zentrale Geruchsverarbeitung

Im Anschluss an die Übertragung der Geruchsinformation von primären auf die sekundären Sinneszellen innerhalb der Glomeruli folgt die zerebrale Geruchsverarbeitung, bei welcher der detektierte Duftstoff bewertet und hinsichtlich seiner Relevanz und Funktion eingeordnet wird. Hierzu wird das Signal von den sekundären Sinneszellen, den Mitral- und Büschelzellen, entlang der lateralen Riechbahn zum primären olfaktorischen Kortex geleitet (Hirata et al., 2019; Imamura et al., 2020). Dieser umfasst den anterioren olfaktorischen Kern, den piriformen Kortex, den periamygdaloiden Kortex, den anterioren kortikalen Kern der Amygdala und den rostralen entorhinalen Kortex (Hummel et al., 2017; T. D. Smith & Bhatnagar, 2019). Im Gegensatz zu der rezeptotopen Projektion der olfaktorischen Rezeptorneurone in die Glomeruli des OBs ist die Projektion des OBs auf den piriformen Kortex räumlich diffus (Cleland & Linster, 2019). Aufgrund der direkten Projektion in kortikale Hirnareale unterscheidet sich der Geruchssinn grundlegend von anderen sensorischen Systemen, wie beispielsweise dem visuellen System, welches afferent primär in den Thalamus projiziert. Im Thalamus erfolgt eine Filterung der Informationen, bevor sie an den Kortex weitergeleitet werden. Diese Funktion übernimmt im olfaktorischen System der OB (Kay & Sherman, 2007). Bei der Geruchswahrnehmung und emotionalen Bewertung spielen darüber hinaus sekundäre und tertiäre Hirnareale, wie Teile des Hippocampus, der Amygdala und des orbitofrontalen Kortex eine Rolle (Gottfried, 2010; Hummel et al., 2017).



1.3 Der histologische Aufbau des Geruchssystems

Zum tieferen Verständnis der Geruchsverarbeitung ist die genaue Kenntnis der allgemeinen histologischen Organisation der zugrunde liegenden Einheiten eine Grundvoraussetzung. Diese ist dank verschiedener immunhistochemischer Analysen menschlicher Autopsiepräparate der letzten Jahre stetig gewachsen. Nichtsdestotrotz beruht der überwiegende Teil der bisherigen Erkenntnisse zur Geruchswahrnehmung auf experimentellen Studien in Säugetieren, allen voran den Nagetieren. Inwieweit sich die Erkenntnis aus anderen Säugetieren auf das menschliche System übertragen lässt, ist unklar. Im Folgenden soll die allgemeine histologische Organisation der Bestandteile der Geruchsverarbeitung des Menschen soweit bekannt vorgestellt werden. In Fällen, in denen das menschliche System noch nicht ausreichend untersucht ist, wird ersatzweise auf Studien in Nagetieren Bezug genommen. Im Zentrum dieser Arbeit stehen die Histologie des OEs und des OBs sowie die neuronale Projektion aus dem OE in den OB. Zentrale Verarbeitungsprozesse wurden der Vollständigkeit halber zum Verständnis des Ablaufs der Geruchswahrnehmung erwähnt, sollen im Folgenden aber nicht näher beleuchtet werden.

1.3.1 Der histologische Aufbau des olfaktorischen Epithels

Die grundsätzliche Struktur sowie Bestandteile des olfaktorischen Epithels ähneln sich bei Mensch und Nagetier stark (Nakashima et al., 1991; Morrison & Costanzo, 1992; Holbrook et al., 2011). So setzt sich das OE im Wesentlichen aus drei Zelltypen zusammen (**Abbildung 1**). Diese sind von apikal nach basal betrachtet die Stützzellen mit Mikrovillarkappen, die in mehreren Schichten angeordneten Zilien-tragenden olfaktorischen Rezeptorneurone und zuletzt die Basalzellen (de Lorenzo, 1957; Nakashima et al., 1991; Morrison & Costanzo, 1992; Huard et al., 1998; Holbrook et al., 2011; Salazar et al., 2019).

Die am weitesten apikal gelegenen Zellen des OEs sind die Stützzellen. Sie umgeben die olfaktorischen Rezeptorneurone und erstrecken sich von der Basallamina aus bis hin zur Epitheloberfläche, wodurch sie, wie bereits der Name suggeriert, das Epithel stabilisieren (Salazar et al., 2019). Stützzellen sichern darüber hinaus das Bestehen eines Ionengleichgewichts, dienen der Produktion des Riechschleims sowie der Biotransformation schädlicher Chemikalien und scheinen an der Phagozytose der Komplexe aus Geruchsstoff-bindenden Proteinen und Duftstoffen nach erfolgreicher Signalübertragung beteiligt zu sein, um die nächste Geruchsstoffbindung zu ermöglichen (Breipohl et al., 1974; Strotmann & Breer, 2011; Heydel et al., 2013).

Die mittlere Schicht des OEs bilden die bipolaren olfaktorischen Rezeptorneurone, deren dendritische Fortsätze 5-30 Zilien tragen und in den Riechspalt reichen (Salazar et al., 2019). Sie exprimieren spezifische olfaktorische Rezeptoren (**Abbildung 1**) und dienen über Bindung von Geruchsstoffen der Initiierung und Weiterleitung der Geruchswahrnehmung (Jones & Reed, 1989; Buck & Axel, 1991; Mombaerts, 1999). Ihre Zellkörper sind in mehreren Schichten in der Mitte des Epithels lokalisiert, wobei ihr Reifegrad von basal nach apikal zunimmt (Morrison & Costanzo, 1992; Calof et al., 2002; Salazar et al., 2019). In der Maus sind gleichartige olfaktorischen Rezeptorneurone, also solche, die den gleichen olfaktorischen Rezeptor exprimieren, anatomisch in einer gemeinsamen Zone des OEs angeordnet (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993).

Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb der Basalzellpopulation gewährleisten die einzigartige Fähigkeit des OEs zur lebenslangen Regeneration (Schwob, 2002; Iwai et al., 2008; Brann et al., 2015; Durante et al., 2020). Unter den Basalzellen unterscheidet man die globosen Basalzellen (GBZ) von den apikal zu ihnen liegenden horizontalen Basalzellen (HBZ) (Schwob, 2002; Salazar et al., 2019). Wie aus Studien an Nagetieren bekannt ist, sind die GBZ für die Aufrechterhaltung der regelmäßigen physiologischen Homöostase der olfaktorischen Nervenzellpopulation verantwortlich, während die HBZ, die auch als Reservestammzellpopulation bezeichnet werden, vorrangig bei schweren Verletzungen des Epithels, aber auch im Rahmen des normalen neuronalen Umsatzes zur Regeneration aller Zellpopulationen des Epithels herangezogen werden (Huard & Schwob, 1995; Leung et al., 2007; Iwai et al., 2008). Basalzellen des Menschen haben im Vergleich zu Nagetieren rundere Zellkörper. Zudem sind die Untergruppen menschlicher HBZ und GBZ nicht so eindeutig voneinander abzugrenzen wie in der Maus (Hahn et al., 2005).

Getrennt durch die Basalzellen liegt unterhalb des OEs die typischerweise breite Lamina propria (Salazar et al., 2019). Diese enthält Bowman-Drüsen (**Abbildung 1**), deren Gänge das gesamte OE durchziehen und deren genaue Funktion bisher weitestgehend unverstanden ist. Diskutiert wird neben der Produktion des Riechschleims, dem Transport von Geruchsstoffen und der Sekretion antimikrobieller Proteine zum Schutz vor Infektionen auch die Beteiligung bei der Entgiftung von Chemikalien mittels Biotransformationsenzymen (Tandler et al., 2000; Kondo et al., 2020). Darüber hinaus finden sich in der Lamina Propria Fibroblasten, Blutgefäße und Nervenfaszikel, welche Axone der im OE liegenden olfaktorischen Rezeptorneurone enthalten, die im weiteren Verlauf Richtung OB ziehen (Nakashima et al., 1991; Morrison & Costanzo, 1992).

Trotz weitreichender Gemeinsamkeiten hinsichtlich des histologischen Aufbaus des OEs bei Nagetieren und Menschen zeigen sich Unterschiede insbesondere in Bezug auf die Verteilung

und Anordnung der beschriebenen Zelltypen. Studien an menschlichen Biopsie- und Autopsiepräparaten zeigen, dass die zonale Verteilung der unterschiedlichen Zelltypen im menschlichen OE häufig von der Ordnung in Nagetieren abweicht. Darüber hinaus finden sich interindividuell große Schwankungen hinsichtlich der neuronalen Dichte. Diese reicht von Neuronen-reichen Epithelien über neuronal verarmte- bis hin zu aneuronalen Epithelien. Darüber hinaus finden sich innerhalb des OEs unabhängig vom Alter Bereiche respiratorischer Metaplasie (Nakashima et al., 1984, 1991; Morrison & Costanzo, 1992; Holbrook et al., 2005, 2011). Als respiratorische Metaplasie wird ursprünglich olfaktorisches Epithel bezeichnet, welches durch respiratorisches Epithel ersetzt wurde und nun rein aus säulenförmigen Flimmerzellen und Basalzellen besteht und damit nicht mehr zur Geruchswahrnehmung fähig ist.

1.3.2 Der histologische Aufbau des olfaktorischen Bulbus

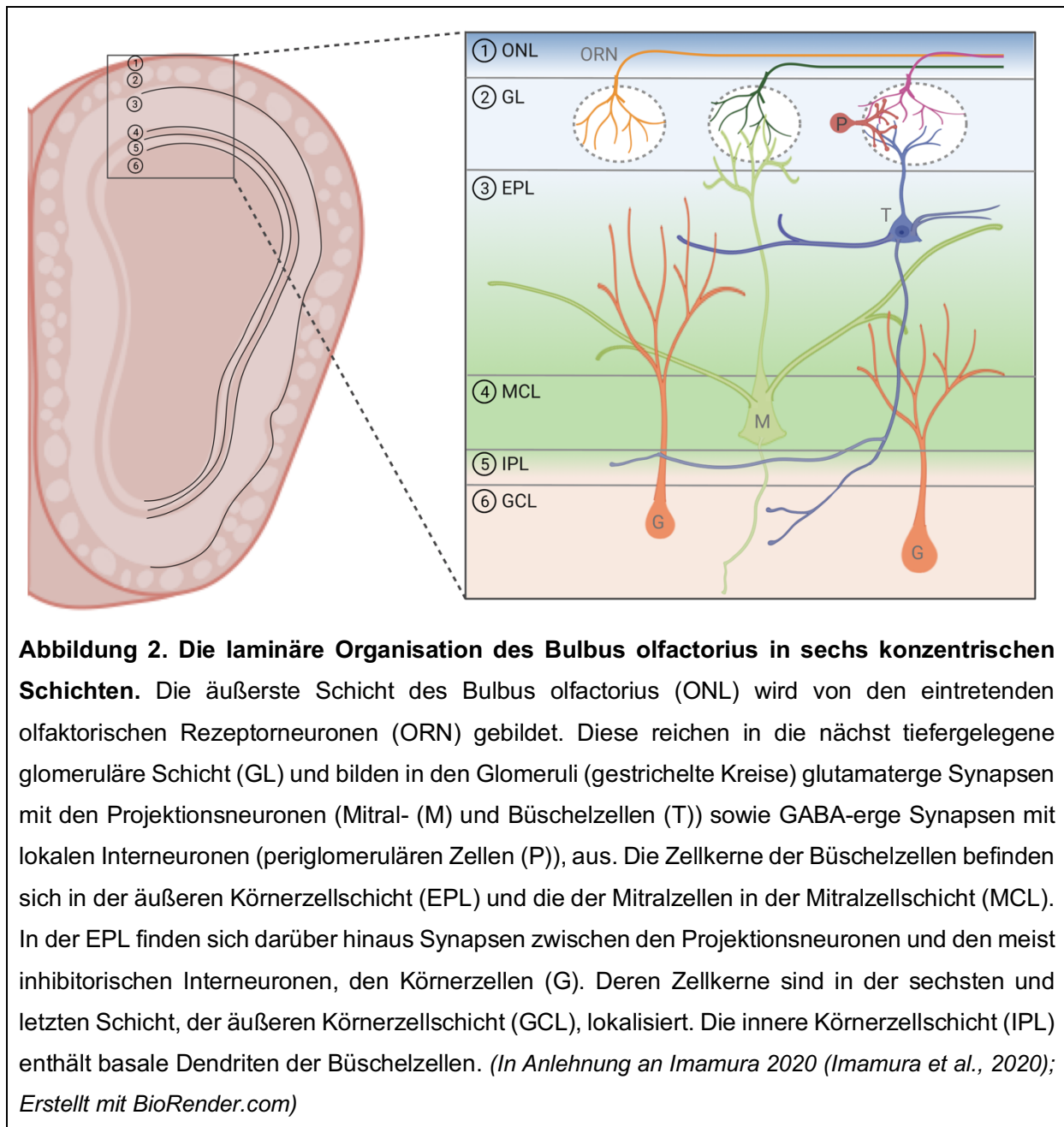
Im Vergleich zu dem, was über das menschliche OE bekannt ist, ist die Literatur über die Organisation des menschlichen OBs relativ spärlich. Entsprechend basiert das aktuelle Verständnis des OBs überwiegend auf den Erkenntnissen aus Nagetieren. Histologisch zeigt der menschliche OB eine mit der Maus vergleichbare laminare Organisation in sechs konzentrischen Schichten (Smith et al., 1991; Maresh et al., 2008) (**Abbildung 2**), deren Organisation im Folgenden im Detail erläutert werden soll.

Die äußerste Schicht des OBs wird von den afferenten, marklosen Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone gebildet. Diese reichen bis in die nächst tiefer gelegene Schicht, die glomeruläre Schicht, und bilden dort in den Glomeruli Synapsen mit den primären Dendriten sekundärer Sinneszellen, den Mitralzellen und Büschelzellen aus (Buck & Axel, 1991; Shepherd & Shepherd, 2004). Olfaktorische Rezeptorneurone sind zur lebenslangen Reproduktion befähigt und projizieren im Bulbus der Maus kontinuierlich und reproduzierbar präzise in die gleichen Glomeruli (P. P. Graziadei & Monti Graziadei, 1983; Schwob, 2002). Inwieweit dieses Wissen auf das menschliche Geruchssystem übertragbar ist, wird kritisch diskutiert (siehe oben). Neben Synapsen zu Projektionsneuronen bilden olfaktorische Rezeptorneurone in der glomerulären Schicht Verbindungen mit Subpopulationen von periglomerulären Zellen aus (Buck & Axel, 1991; Patel et al., 2022). Hierbei handelt es sich entsprechend den Erkenntnissen aus Studien an Nagetieren um eine heterogene Population von Interneuronen, die eingehende sensorische Informationen modulieren, indem sie die Aktivität der Mitral- und Büschelzellen modifizieren, bevor diese die Erregung über ihre Axone gebündelt im Tractus olfactorius in höher gelegene Strukturen des Gehirns weiterleiten (Richard et al., 2010; Wu et al., 2020; Lodovichi, 2021).

Auf die glomeruläre Schicht folgt als dritte Schicht die äußere Körnerzellschicht. Diese enthält die Zellkerne der Büschelzellen sowie Synapsen von sekundären lateralen Dendriten der Projektionsneurone und lokalen, meist inhibitorischen Interneuronen wie den Körnerzellen (Huart et al., 2013; Ke et al., 2013; Wu et al., 2020). Diese dendro-dendritischen Synapsen können durch Freisetzung von γ -Aminobuttersäure (GABA) die Signalweiterleitung der Sekundärdendriten der Projektionsneurone, also der Mitral- und Büschelzellen, lokal hemmen und somit das Geruchssignal modulieren (Xiong & Chen, 2002).

Es folgen als vierte Schicht die Mitralzellschicht, bestehend aus den Zellkernen der Mitralzellen, und als fünfte und sechste Schicht die innere Körnerzellschicht und granuläre Zellschicht, die die basalen Dendriten der Büschelzellen sowie die Zellkerne der Körnerzellen enthalten, welche GABAerge Interneurone sind (Huart et al., 2013; T. D. Smith & Bhatnagar, 2019).

Trotz der vergleichbaren histologischen Grundordnung zeigen Studien an menschlichen Autopsiepräparaten des OBs deutliche Unterschiede zu den Erkenntnissen aus Nagetieren. Insgesamt scheint die laminare Organisation des menschlichen OBs weniger streng. Zudem umfassen einzelne Schichten wie die Nervenzellschicht und die glomeruläre Schicht den Bulbus teilweise nicht in seiner ganzen Zirkumferenz (Smith et al., 1991; Maresh et al., 2008). Anzahl, Größe und Form der Glomeruli sind beim Menschen im Vergleich zu Nagetieren weniger uniform und weisen eine höhere inter- und intraindividuelle Varianz auf (Smith et al., 1991; Maresh et al., 2008; Zapiec et al., 2017). Ferner reichen die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone vereinzelt in tiefere Schichten des Bulbus jenseits der üblicherweise bei Nagetieren zu beobachtenden glomerulären Schicht und bilden ektope Glomeruli (Hoogland et al., 2003). Der Grund für dieses Phänomen ist bislang ungeklärt. Es wird jedoch spekuliert, dass die ektopen Glomeruli den beschriebenen tieferreichenden Axonen von olfaktorischen Rezeptorneuronen entsprechen, die keine synaptische Verbindung mit Dendriten sekundärer Sinneszellen ausbilden konnten (Hoogland et al., 2003).



1.4 Veränderungen des olfaktorischen Epithels und des olfaktorischen Bulbus im Alter

Anders als primäre Sinneszellen des visuellen oder akustischen Systems treten die olfaktorischen Rezeptorneurone zur Wahrnehmung von Gerüchen direkt mit der Umwelt in Kontakt und sind damit der ständigen Gefahr vor Verletzungen durch Infektionen, Toxine oder Chemikalien ausgesetzt. Um den evolutionär betrachtet überlebenswichtigen Geruchssinn dennoch weitestgehend intakt zu halten, ist das menschliche Riechepithel dank Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb der Basalzellpopulation grundsätzlich zu lebenslanger Regeneration fähig (Schwob, 2002; Brann et al., 2015; Durante et al., 2020).

Trotz dieser lebenslangen Regenerationsfähigkeit ist die Verschlechterung der Geruchsfunktion mit zunehmendem Alter bekannt (Doty et al., 1984; Vennemann et al., 2008; Hüttenbrink et al., 2013; Zhang & Wang, 2017; Tzeng et al., 2021; Lu et al., 2021). Ab etwa dem 40. Lebensjahr kommt es zu einer langsamen, aber stetigen Abnahme der Geruchsfunktion, welche sich nach dem 60. Lebensjahr beschleunigt (Patel et al., 2022). Querschnittsstudien zeigen, dass 14-50 % der über 65-Jährigen und bis zu 80 % der über 80-Jährigen unter einem verminderten Riechvermögen leiden (Murphy, 2002; Landis et al., 2003; Welge-Luessen et al., 2005; Bhatia-Dey & Heinbockel, 2021; Patel et al., 2022). Klinisch wird dies unter dem Begriff der Presbyosmie zusammengefasst, welche das Bild einer trockenen Nase, nasaler Obstruktion sowie Geruchsstörungen umfasst (DelGaudio & Panella, 2016). Darüber hinaus kommt es bei bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz oder dem idiopathischen Parkinson-Syndrom bereits in frühen Krankheitsphasen zu einer signifikanten Reduktion des Geruchssinns (Hummel et al., 2007; Barresi et al., 2012; Doty, 2012; Mobley et al., 2014; Doty & Kamath, 2014; Attems et al., 2015; Doty, 2017; Bhatia-Dey & Heinbockel, 2021). Es ist anzunehmen, dass die Verschlechterung des Geruchssinns im Alter und bei neurodegenerativen Erkrankungen auf histopathologischen Veränderungen des OEs sowie OBs in Bezug auf deren Umfang, Struktur und histologische Zusammensetzung beruht. So ist beispielsweise bekannt, dass das Volumen des OBs in engem Zusammenhang mit der Geruchsempfindlichkeit steht und bei Patienten:innen mit Geruchsstörungen, z. B. nach Infektionen oder Traumata unabhängig vom Alter verringert ist (Mueller et al., 2005; Rombaux et al., 2006). Im Folgenden sollen in Kürze die bereits bekannten histopathologischen Veränderungen des OEs und OBs im Alter zusammengefasst werden.

1.4.1 Die histopathologischen Veränderungen des olfaktorischen Epithels im Alter

Die histopathologischen Veränderungen des OEs im Alter lassen sich grob in eine kontinuierliche Degeneration der beschriebenen Zelltypen sowie Zunahme dysplastischer, nicht zur olfaktorischen Wahrnehmung befähigter Epithelien zusammenfassen.

Neben einer allgemeinen Reduktion der Epitheldicke verliert das OE des Menschen und der Nagetiere im Alter im Spezifischen an ausgereiften olfaktorischen Rezeptorneuronen und an intraepithelialen Gefäßen (Naessen, 1971; Paik et al., 1992; Loo et al., 1996; Rosli et al., 1999; Mobley et al., 2014; Doty & Kamath, 2014; Attems et al., 2015). Als Ursache hierfür wird neben dem Verlust von regenerativen basalen Stammzellen eine Änderung der Transkription der HBZ diskutiert (Oliva et al., 2022). Zudem finden sich im OE mit zunehmendem Alter vermehrt Bereiche von nicht-sensorischem, respiratorischem Epithel, was auf ein Versagen der Aufrechterhaltung der physiologischen Hämostase mit steigendem Alter hindeuten könnte (Paik et al., 1992; Holbrook et al., 2011). Wenn auch kein spezifischer Zusammenhang mit

dem Alter bekannt ist, werden sog. Neurome, abnormale Bereiche im olfaktorischen Epithel, charakterisiert durch desorganisierte olfaktorische Axone, häufig im menschlichen OE beschrieben (Trojanowski et al., 1991; Holbrook et al., 2005, 2016). Derartige Veränderungen sind zumindest in einem vergleichbaren Ausmaß aus Mausmodellen für olfaktorische Alterung nicht bekannt (Holbrook et al., 2005; Trojanowski et al., 1991).

1.4.2 Die histopathologischen Veränderungen des olfaktorischen Bulbus im Alter

Die histopathologischen Veränderungen des OBs im Alter sind im Vergleich zum OE weniger gut untersucht. Bisherige Studien am OB des Menschen und von Nagetieren zeigen neben einer Abnahme des Bulbusvolumens eine Reduktion der Anzahl an Glomeruli und den Verlust glomerulärer Dendriten und Mitralzellen als Funktion des Alters (Hinds & McNelly, 1981; Bhatnagar et al., 1987; Meisami et al., 1998; Buschhüter et al., 2008; Attems et al., 2015). Andere Studien hingegen postulieren eine stabile glomeruläre Dichte und gleichbleibende Ordnung der einzelnen Schichten mit zunehmendem Alter (Maresh et al., 2008; Richard et al., 2010; Mobley et al., 2014). Wie zu Beginn ausgeführt, hängt die Fähigkeit, Gerüche zu identifizieren bei Nagetieren maßgeblich von der präzisen rezeptotopen Projektion der Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone in die Glomeruli des OBs und die dadurch entstehenden einzigartigen glomerulären Aktivierungsprofile ab. Eine Studie an Mäusen ergab eine Abnahme dieser präzisen Projektion olfaktorischer Rezeptorneurone in spezifische Glomeruli mit zunehmendem Alter, was zu einem fehlerhaften glomerulären Aktivierungsprofil führen und ein Korrelat altersbedingten Geruchsverlust darstellen könnte (Costanzo & Kobayashi, 2010, p. 2). Jenseits der beschriebenen mikroskopischen Veränderungen kommt es im Alter zu einer Verknöcherung der Siebbeinplatte mit konsekutivem Verschluss einzelner Neuroforamina, durch welche die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone ziehen, um in den OB zu projizieren (Kalmey et al., 1998).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie im Vorangegangenen dargestellt, sind der grundlegende Ablauf der Geruchswahrnehmung im Menschen, die Projektion aus der Peripherie in zentrale Strukturen sowie Veränderungen im Alter als mögliches Korrelat des altersbedingten Geruchsverlusts zu großen Teilen unverstanden. Eine Beeinträchtigung des Geruchssinns im Alter ist aber häufig und resultierende Beeinträchtigungen gehen weit über den reinen Verlust der Wahrnehmung von Geruchsstoffen hinaus. Neben einer Reduktion der allgemeinen Lebensqualität und einer gesteigerten Mortalität werden Gewichtsverlust sowie psychischen Erkrankungen wie Depression und Angststörungen mit der Beeinträchtigung des Geruchssinns assoziiert (Miwa et al., 2001; Croy et al., 2014; Wang et al., 2020; Uchida et al., 2020; Schäfer et al., 2021).

Obwohl die Störung der Geruchsfunktion also mit ernsthaften Risiken, Einschränkungen und Komorbiditäten einhergeht und einen großen Teil der Bevölkerung betrifft, wurde ihr in der Vergangenheit verglichen mit Störungen anderer Sinnesfunktionen, wie dem Sehen oder dem Gehör wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Für ein tieferes Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Abläufe des menschlichen Geruchssinns bedarf es zunächst der Kenntnis des genauen Aufbaus und der Zusammensetzung der zugrunde liegenden anatomischen Bestandteile. Hierbei stellt jedoch insbesondere die begrenzte Verfügbarkeit von menschlichen Autopsiepräparaten eine große Hürde dar. So ist das Wissen über den Aufbau des menschlichen OEs und OBs sowie deren Veränderungen im Alter auf die Ergebnisse weniger deskriptiver Studien an menschlichen Geweben und überwiegend auf Vergleiche zu Erkenntnissen aus dem Modelltier Maus beschränkt. Detaillierte quantitative Analysen des menschlichen Geruchssystems hingegen fehlen weitestgehend.

Wenngleich Erkenntnisse aus der Maus in den letzten Jahrzehnten maßgeblich zu einem besseren Verständnis des Geruchssystems beigetragen haben, so weist die Maus als Modelltier, wie bereits aufgezeigt, dennoch deutliche strukturelle Unterschiede zum Menschen auf. Unabhängig davon muss berücksichtigt werden, dass Versuchstiere in der Regel in ventilierten, pathogen-freien Käfigen aufwachsen und daher im Vergleich zum Menschen einer beschränkten olfaktorischen Vielfalt ausgesetzt sind. Weiterhin zeigen sich Unterschiede im Lebensstil, dem Alter und der genetischen Diversität zwischen Maus und Mensch, die zu den beobachteten Unterschieden beitragen könnten. So stammen murine Studien beispielsweise meist aus einem vergleichsmäßig jungen Kollektiv an Tieren (Treloar et al., 2002; Gabellec et al., 2007; Kikuta et al., 2013), Studien an menschlichen Geweben hingegen erfolgten bislang im Gegensatz dazu überwiegend an post mortem Autopsiepräparaten, was ein verhältnismäßig altes Patientenkollektiv bedingt (Smith et al., 1991; Maresh et al., 2008; Zapiec et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit war es daher, das humane OE und den humanen OB mittels einer umfangreichen qualitativen, aber auch quantitativen Analyse menschlicher Autopsiepräparate verschiedenen Alters histologisch zu charakterisieren. Neben adultem Gewebe konnte ich hierzu auf Proben fetalen Gewebes zurückgreifen, welche mir ermöglichten, das sich entwickelnde Geruchssystem mit dem gealterten Zustand zu vergleichen. In vielen Fällen stand von einer Person sowohl das OE als auch die zugehörigen OBs zur Verfügung, sodass ich erstmals eine quantitative Analyse der menschlichen axonalen Projektion aus der olfaktorischen Peripherie in den OB untersuchen konnte. Nach der grundlegenden Analyse des histologischen Aufbaus und der axonalen Projektion aus dem OE in den OB untersuchte

ich in einem zweiten Schritt mögliche histopathologische Veränderungen des OEs und OBs im Zusammenhang mit Alter und Demenz.

1.6 Hypothesen

Ich formulierte meine Fragestellungen und Hypothesen wie folgt.

(1) Eine qualitative und quantitative Analyse des menschlichen Geruchssystems im Laufe des Lebens – der makroskopische und mikroskopische Aufbau des olfaktorischen Epithels

Verändert sich die Ausdehnung und Lokalisation des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die anatomischen Strukturen mit zunehmendem Alter?

- a) Die Gesamtfläche des olfaktorischen Epithels nimmt mit zunehmendem Alter ab.
- b) Altersbedingte Veränderungen sind überwiegend im Bereich des anterodorsalen Septums und den gegenüberliegenden Epithelien der Nasenmuscheln lokalisiert.

Aus welchen Zelltypen ist das menschliche Riechepithel des Embryos und des Erwachsenen zusammengesetzt? - Unterscheiden sich die Anzahl bestimmter Zelltypen signifikant im Alter?

- a) Die Anzahl olfaktorischer Rezeptorneurone korreliert linear und invers mit dem Alter.
- b) Die Anzahl globaler Basalzellen korreliert linear und invers mit dem Alter.

Welche Unterschiede finden sich im histologischen Aufbau des olfaktorischen Epithels über die Lebensspanne? – Stehen diese in direkten Zusammenhang mit dem Alter?

- a) Die Anzahl an Neuromen korreliert linear mit dem Alter.
- b) Die Anzahl submuköser Zysten korreliert linear mit dem Alter.
- c) Das Ausmaß respiratorischer Metaplasie korreliert linear mit dem Alter.

Welche histopathologischen Unterschiede finden sich im Aufbau und der Zusammensetzung des olfaktorischen Epithels bei Patienten:innen mit dokumentierter Demenzerkrankung in Vergleich zu Gesunden?

- a) Die Anzahl dysfunktionaler Neurome korreliert mit der Diagnose einer Demenzerkrankung.

(2) Eine qualitative und quantitative Analyse des menschlichen Geruchssystems im Laufe des Lebens – der makroskopische und mikroskopische Aufbau des olfaktorischen Bulbus.

Verändert sich die Ausdehnung des olfaktorischen Bulbus mit dem Alter?

- a) Das Volumen des olfaktorischen Bulbus korreliert linear und invers mit dem Alter.

Aus welchen Zelltypen ist der menschliche olfaktorische Bulbus des Embryos und des Erwachsenen zusammengesetzt? - Unterscheiden sich die Anzahl bestimmter Zelltypen signifikant im Alter?

- a) Die Anzahl von Glomeruli korreliert linear und invers mit dem Alter.
- b) Die Anzahl an Mitralzellen korreliert linear und invers mit dem Alter.

Welche Unterschiede finden sich im histologischen Aufbau des menschlichen olfaktorischen Bulbus über die Lebensspanne? Stehen diese in direktem Zusammenhang mit dem Alter?

- a) Die Anzahl ektooper Glomeruli korreliert linear und invers mit dem Alter.

Lässt sich der neuronale Status des olfaktorischen Bulbus am neuronalen Status des olfaktorischen Epithels ableiten?

- a) Die Anzahl der Glomeruli korreliert linear mit der neuronalen Dichte des olfaktorischen Epithels.

Welche histopathologischen Unterschiede finden sich im Aufbau und der Zusammensetzung des olfaktorischen Bulbus bei Patienten:innen mit dokumentierter Demenzerkrankung im Vergleich zu Gesunden?

- a) Die Anzahl ektooper Glomeruli korreliert mit der Diagnose einer Demenzerkrankung.

2 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt befasst sich ausführlich mit den Methoden dieser Studie, die in gekürzter Fassung im Journal of Comparative Neurology publiziert wurden.

Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E., & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. Journal of Comparative Neurology, 1–22.

Die Arbeit erfolgte gefördert durch das Stipendium „great!ipid4all“ des DAADs (Deutschen Akademischen Austauschdienst) im Rahmen eines einjährigen Forschungsstipendiums („research fellowship“) der Harvard Medical School in Boston. Die Experimente führte ich im Zeitraum vom September 2017 bis September 2018 an der Tufts University School of Medicine unter Nutzung und Anleitung des Labors des Instituts Developmental, Molecular and Chemical Biology von Prof. James Schwob, M.D., PhD durch.

Die Studie umfasst eine umfangreiche histologische Charakterisierung der zum menschlichen Geruchssystem gehörenden anatomischen Strukturen. Es erfolgte eine detaillierte qualitative histologische Analyse des OEs, der dazugehörigen OBs sowie der neurogenen Projektionen aus dem OE in den OB. Anschließend wurde eine quantitative Auswertung ausgewählter Parameter der genannten Strukturen, insbesondere in Bezug auf Veränderungen mit zunehmendem Alter und Demenz durchgeführt. Embryonale Gewebeproben dienten als Referenz für ein intaktes Geruchssystem.

2.1 Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes

Die histologische Analyse erfolgte an menschlichen Autopsiepräparaten von insgesamt 36 Spendern:innen (12 Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 74 Jahren (28-92 Jahre) und zwei Embryos (22. und 23. Gestationswoche). Die Präparate wurden durch die drei folgenden Entnahmezentren innerhalb der USA bereitgestellt: 1. National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA), 2. Advanced Bioscience Resources Inc. (ABR, Alameda, CA) und 3. Anatomy Gifts Registry (AGR, Hanover, MD). Die Entnahme der Präparate sowie deren Fixierung in 10%igen Formaldehyd erfolgte durch die Zentren innerhalb von maximal 24 h nach dem Todeszeitpunkt der Autopsiespender:innen. Anschließend wurden die Präparate innerhalb von 14-21 Tagen zur weiteren Analyse an das Labor der Tufts University in Boston versandt. Die örtlichen Institutionen befanden, dass für die Analyse dieses anonymisierten Gewebes kein Ethikantrag notwendig ist. Die Autopsiespender:innen hatten ante mortem ihr Einverständnis zur Entnahme gegeben.

Die anatomischen Präparate umfassten neben den beiden OBs, die Siebbeinplatte, die mittlere und obere Nasenmuschel sowie das Septum, welches sich vom Sinus frontalis (Stirnhöhle) bis zum Sinus sphenoidalis (Keilbeinhöhle) erstreckt (**Abbildung 3A**). Zur histologischen Analyse wurden die OBs und die Riechschleimhaut, welche das OE enthält, zunächst gemäß etablierte Verfahren (Holbrook et al., 2011) separiert. Hierzu wurden die OBs vorsichtig von der Siebbeinplatte gelöst und für die spätere Orientierung entsprechend ihrer Position und Seite beschriftet (**Abbildung 3C**). Die OE enthaltenden Nasenmuscheln jedes Präparates wurden entlang der Siebbeinplatte in einen seitlichen Anteil (Seitenwand) und einen Septumanteil (Septum) unterteilt und ebenfalls entsprechend markiert (**Abbildung 3D**).

Zur weiteren Analyse des OEs wurde die Riechschleimhaut der Seitenwand und des Septums weiter aufbereitet (**Abbildung 3D**): Einerseits wurden vollständige Riechepithelblätter sowohl des Septums als auch der Seitenwand entnommen, um eine möglichst ganzheitliche Bewertung der olfaktorischen Peripherie vorzunehmen und Verfälschungen durch die Analyse einzelner Gewebeschnitte zu vermeiden, welche möglicherweise nicht das gesamte olfaktorische System abbilden. Andererseits wurden aus den gesamten Schleimhautblättern je ein rechteckiger, vertikal ausgerichteter Quader entnommen, um einzelne Bestandteile des OEs im Detail aufzuarbeiten. Dieser Quader wurde in „Optimal cutting temperature“ (OCT) Medium (Miles Inc., Elkhart, IN) eingebettet, eingefroren und mit einem Kryostat (Leica CM3050S, Bannockburn, IL) in 10-12 µm dicke Epithelschnitte geschnitten (**Abbildung 3**). Auch OBs wurden in OCT-Medium eingebettet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und in koronarer Schnittführung auf 10-16 µm dicke Schnitte präpariert. Eine derartige Aufbereitung in dünne Gewebeschnitte des OEs und OBs ermöglicht im Vergleich zur Färbung ganzer Schleimhautblätter / Bulbi, dass die verwendeten Primärantikörper effektiver ihre entsprechenden Zielantigene erreichen. Nach dem Schneiden wurden sowohl die Schnitte des OEs als auch des OBs auf Plus-Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Pittsburg, PA) aufgenommen und bis zum eigentlichen Färbeprozess bei -20° Celsius gelagert.

Zu jedem Präparat lagen demografische Informationen zu Alter, Geschlecht, Todesursache und Begleiterkrankung vor, die von den Autopsiezentren bereitgestellt wurden. Diese können im Ergebnisteil der Tabelle 2 entnommen werden. Informationen über die Riechfunktion lagen nicht vor.

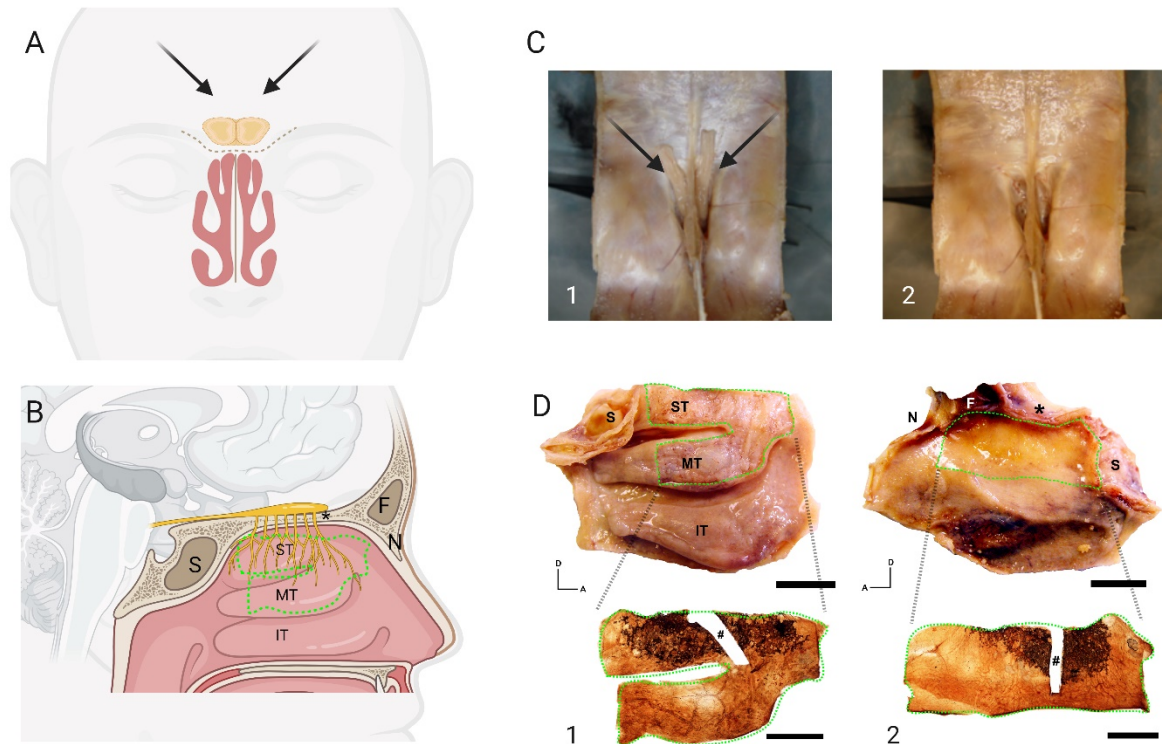


Abbildung 3. Aufbereitung der olfaktorischen Bulbi und Riechepithelien

A und B. Schematische Darstellung der OBs und der Riechschleimhaut inklusive des OEs in Bezug auf anatomische Landmarken. Die grün gestrichelte Linie entspricht exemplarisch dem Bereich eines vollständig entnommenen Riechepithelblatts der Seitenwand. **C.** Dorsalansichten einer Autopsieprobe eines 92-jährigen Manns vor (**C1**) und nach (**C2**) der Entfernung der OBs (**schwarze Pfeile**). **D.** Ganze Schleimhautblätter der linken Nasenhöhle eines 80-jährigen Mannes. Das Autopsiepräparat der linken Nasenhöhle wurde in Längsrichtung entlang der Siebbeinplatte (**Sternchen**) gespalten, wobei die Schleimhäute der Seitenwand (**D1**) und des Septums (**D2**) freigelegt wurden. Ganze Schleimhautblätter der Seitenwand und des Septums, die den Bereich des OEs umfassen, wurden aus dem Präparat entfernt (**grün gestrichelte Linie**) und anschließend mit dem neuronalen Marker Anti-Beta-III-Tubulin (TUJ1) und DAB (**braun**) als Farbstoff auf das Vorkommen olfaktorischer Rezeptorneurone gefärbt (**D unten**). Für die weitere Analyse wurde vor der Färbung ein rechteckiger, vertikal ausgerichteter Quader entnommen (#). **A** = Anterior; **D** = Dorsal; **F** = Stirnhöhle (Sinus frontalis); **N** = Nasenbein; **S** = Keilbeinhöhle (Sinus sphenoidalis); **IT** = untere Nasenmuschel; **MT** = mittlere Nasenmuschel; **ST** = obere Nasenmuschel; Maßstäbe = 15 mm. (in Anlehnung an Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022); Erstellt mit biorender.com)

2.2 Immunhistochemische Analyse

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Färbungen erfolgten unter Anwendung verschiedener immunhistochemischer Verfahren, deren grundlegende Methoden im Folgenden kurz eingeführt werden sollen.

2.2.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) ermöglicht die Visualisierung von Proteinen oder anderen Zielantigenen in Gewebeschnitten unter Verwendung von Fluorophoren als Färbemittel, welches an Antikörper gebunden ist, die direkt oder indirekt an das gewünschte Zielantigen binden (Aros, 2022; Donaldson, 1998).

2.2.1.1 Fixierung und Antigen-Rückgewinnung

Vor dem eigentlichen Färbeprozess werden die zu untersuchenden biologischen Gewebe fixiert, um die gewünschten Zielantigene zu immobilisieren und autolytische Prozesse zu verhindern (Im et al., 2019). Idealerweise werden hierbei die Zielepitope nicht in ihrer Morphologie verändert. Die Fixierung führt jedoch naturgemäß zu strukturellen Veränderungen der Proteine sowie Ausbildung von Quervernetzungen, welche die gewünschten Epitope maskieren und somit die Bindung von Primärantikörpern behindern können (Dunkenberger & Del Valle, 2022; Im et al., 2019). Dies hat letztendlich einen negativen Einfluss auf die Immunreaktivität. Nicht jede Fixierungsmethode verändert oder demaskiert alle Zielepitope gleichermaßen, sodass für unterschiedliche Antigene die geeignete Fixierungsmethode gefunden werden muss. In dieser Studie wurde Formaldehyd als Fixierungssubstanz angewendet. Formaldehyd bildet über Bindung an Zell- und Gewebekomponenten intra- sowie intermolekulare Methylenbrücken und fixiert auf diese Weise das Gewebe (Im et al., 2019).

Um die gegebenenfalls durch die Fixierung maskierten Epitope wieder sichtbar zu machen, erfolgt nach der Fixierung ein Schritt zur Antigen-Rückgewinnung. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen zwei Arten: 1. Hitze-induzierte Epitop Rückgewinnung (HIER) und 2. Protease-induzierte Epitop Rückgewinnung (PIER) (Im et al., 2019). Beim HIER wird die Gewebeprobe gemeinsam mit einer Pufferlösung erhitzt, wobei die Wärme zur Aufspaltung der Quervernetzungen und die Pufferlösung zur Aufrechterhaltung der Proteinkonformation führen soll (Im et al., 2019). Beim PIER werden Enzyme wie beispielsweise Trypsin oder Pepsin verwendet, um Proteinquervernetzungen zu spalten und so das Zielepitop freizulegen. Diese Spaltung ist jedoch unspezifisch und kann die Konformation der Zielepitope negativ beeinflussen (Ramos-Vara, 2017). Um darüber hinaus den Zugang der Antigen-bindenden Antikörper zu intrazellulär gelegenen Epitopen zu gewährleisten, kann das Gewebe

anschließend mit Permeabilisierungsreagenzien wie beispielsweise Wasserstoffperoxid behandelt werden.

2.2.1.2 Allgemeine Immunfluoreszenz-Färbung

Im Anschluss an die Fixierung, die Antigen-Rückgewinnung und die Permeabilisierung erfolgt die eigentliche IF-Färbung mit Inkubation der Antigen-bindenden Antikörpern (Im et al., 2019).

Im Wesentlichen unterscheidet man bei der IF-Färbung die zwei Formen der direkten (**Abbildung 4.1**) und indirekten IF-Färbung (Aros, 2022; Donaldson, 1998) (**Abbildung 4.2**). Bei der direkten IF-Färbung ist der gegen das Zielantigen gerichtete Primärantikörper direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. In der indirekten IF-Färbung erfolgen hingegen mindestens zwei Inkubationsschritte: 1. Inkubation mit einem Primärantikörper, der das gewünschte Zielantigen bindet, und 2. Inkubation mit einem Sekundärantikörper, welcher einen fluoreszierenden Farbstoff trägt und gegen ein Wirtsantigen des Primärantikörpers bindet. So folgt beispielsweise auf die Inkubation mit einem IgG-Primärantikörper, gezüchtet in der Maus (Maus-IgG-Primärantikörper), eine Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper, der im Hasen gezüchtet wurde (fluoreszenzmarkierter Hase-Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper) (Aros, 2022; Donaldson, 1998). Durch Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper können in einem Gewebeschnitt gleichzeitig verschiedene Epitope visualisiert werden. Bei der indirekten IF-Färbung müssen hierzu die Primärantikörper aus zwei unterschiedlichen Wirten stammen (z.B. der Maus und dem Hasen). Andernfalls würden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper undifferenziert die Primärantikörper binden und eine Unterscheidung zwischen den Antigenen wäre nicht möglich. Gleichzeitig müssen die Sekundärantikörper unterschiedliche fluoreszierende Farbstoffe tragen.

2.2.1.3 Möglichkeiten der Signalverstärkung

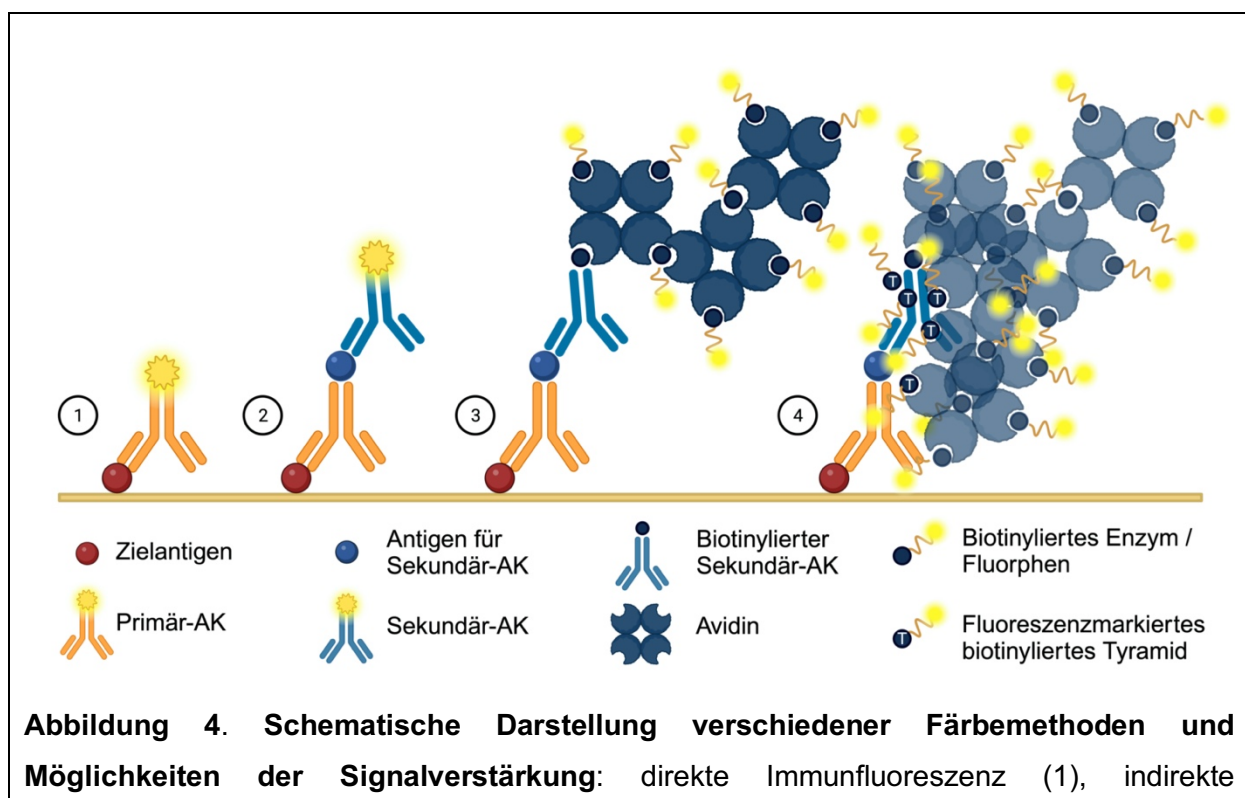
Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex Methode ist eine Form der indirekten IF-Färbung mit integrierter Signalverstärkung, bei welcher sich die starke Affinität von Avidin zu Biotin zu Nutze gemacht wird (Bratthauer, 2010) (**Abbildung 4.3**). Zur Visualisierung des Zielantigens wird ein Sekundärantikörper über eine Avidin-Biotin-Bindung, anstelle einer einzelnen Bindungsstelle, zur Signalverstärkung an mehreren Stellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff oder mit einem Enzym, welches die Färbereaktion katalysiert, gekoppelt. Dazu wird im ersten Schritt der sekundäre Antikörper, der gegen den Antigen-erkennenden Primärantikörper gerichtet ist, mit Biotin konjugiert und auf das Gewebe gegeben. Darüber hinaus wird ein Fluorphen oder ein Enzym mit Biotin konjugiert. Dieses biotinylierte Fluorphen/Enzym wird anschließend nach

Hinzugabe von Avidin durch selbiges gebunden, wobei jedes Avidin-Molekül vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und umgekehrt auf jedem biotinolierten Fluorphen/Enzym zwei Bindungsstellen für Avidin vorliegen, sodass ein Gitternetz aus Avidin-Biotin-Fluorphen/Enzym Komplexen (ABC-Komplex) entsteht. Dieser ABC-Komplex wird nachfolgend auf das Gewebe gegeben, welches bereits gebundene Primär- und Sekundärantikörper enthält. Hier bindet der ABC-Komplex an den biotinilierten sekundären Antikörper und visualisiert auf diese Weise das Antigen. Diese Visualisierung ist aufgrund der Konjugation mit mehreren Fluorphenen/zur Fluoreszenz angeregten Enzymen im Vergleich zur sekundären IF-Färbung mit nur einem Fluorphen verstärkt (**Abbildung 4.3**).

Tyramid verstärkte Avidin-Biotin-Komplex-Methode - TSA

Soll die Avidin-Biotin-Komplex Methode weiter verstärkt werden, kann diese in Kombination mit biotiniliertem fluoreszenzmarkiertem Tyramid angewendet werden (TSA) (Bratthauer, 2010) (**Abbildung 4.4**). Hierzu wird Tyramid mit fluoreszenzmarkiertem Biotin konjugiert und auf das Gewebe gegeben, welches bereits mit dem Primärantikörper, biotinilierten Sekundärantikörper und Streptavidin-Komplexen inkubiert wurde. Katalysiert durch Hinzugabe von Peroxidase, in unserem Fall Horseradish Peroxidase (HRP), wird das an Tyramid gebundene Biotin an der Enzymstelle abgelagert. Dies führt zur einer verstärkten Anzahl von Biotinmolekülen um das Zielantigen. Da diese Biotinmoleküle selbst fluoreszieren und zusätzlich enzymmarkierte/fluoreszenzmarkierte Avidin-Biotin-Komplexe binden können, kann durch diese Methode das Signal verstärkt werden (Bratthauer, 2010).



2.2.2 Färbung der Gewebeschnitte des Riechepithels und des Bulbus olfactorius

Nach Einführung in die allgemeine Methode der Immunhistochemie und die erforderlichen Schritte vor der eigentlichen Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern (Fixierung, Antigen-Rückgewinnung, Permeabilisierung) soll im Folgenden das spezifisch in dieser Studie angewendete Färbeprotokoll vorgestellt werden:

Nach dem Auftauen der Gewebeschnitte wurden die Objektträger für fünf Minuten in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült, um überschüssiges OCT (Eindeckmedium) zu entfernen. Zur Permeabilisierung des Gewebes und Minimierung der inhärenten Peroxidase-Aktivität behandelte ich die Schnitte anschließend für 10 min mit 0,1 %igen Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Peroxidasen kommen natürlicherweise in biologischen Geweben vor und können durch Interaktion mit Substraten der Färbung zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen und so die Spezifität der Färbung reduzieren (Dunkenberger & Del Valle, 2022). Nach initialer Fixierung mit Formaldehyd (siehe Abschnitt 2.1. Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes) erfolgte die Antigenrückgewinnung zur Gewährleistung der Bindung primärer Antikörper mittels HIER. Hierzu legte ich das Gewebe mit 0,01 M Zitronensäurepuffer (pH von 6,0) beträufelt und für 10 min bei 45 °C in einen herkömmlichen Dampfgarer. Nachfolgend wurden die Objektträger erneut für 5 min in PBS gewaschen und für 10 min mit der Blockierungslösung „Normal Donkeyblock“ (NDB – 4 % Rinderserumalbumin (BSA), 5 % Non Fat Dry Milk (NFDM), 10 % Eselserum, PBS, 0,1 % Triton X-100) geblockt. Das im NDB enthaltende BSA, NFDM und Eselserum deckt unspezifische Bindungsstellen ab und hilft so ebenfalls unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren und schlussendlich die Spezifität der Färbung zu erhöhen. Das in der NDB-Lösung enthaltende Triton-X dient, wie auch das zu Beginn verwendete H₂O₂, der Permeabilisierung.

Nach diesen Vorbereitungen wurden die Primärantikörper unterschiedlich stark in NDB verdünnt (**Tabelle 1**) und auf die Gewebeschnitte gegeben. Die in dieser Studie verwendeten Primärantikörper und ihre Färbebedingungen (Konzentrationen und Vorbehandlungen) sowie der von jedem Antikörper erkannte Zelltyp sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für einige Zielantigene musste ich in Vorversuchen zunächst die optimalen Dosierungen und Färbe-Bedingungen (Wahl der Antigen-Rückgewinnung, des Permeabilitätsreagenzes und des Amplifikationsverfahren) ermitteln. Die Spezifität der verwendeten Antikörper bezüglich der gewünschten Antigene wurde entweder zuvor durch die Inkubation mit einem Antiserum

bestätigt oder basierte auf identischen Färbeprofilen, die bereits in früheren Veröffentlichungen (siehe Tabelle 1) beschrieben wurden.

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer befeuchteten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Zur Entfernung nicht gebundener, überschüssiger primärer Antikörper wurden die Schnitte anschließend drei Mal für 5 min in 0,5 % BSA/PBS gewaschen. Gebundene primäre Antikörper wurden anschließend entweder durch Inkubation mit einem geeigneten fluoreszenzkonjugierten sekundären Antikörper (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) oder dem entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, Konzentration 1:50, Inkubationszeit 1 h), gefolgt von fluoreszierenden Streptavidin-Komplexen (Konzentration 1:200, Inkubationszeit 45 min) sichtbar gemacht. Die Antigene Transkriptionsfaktor T-Bet 21 (Tbx21) und Tyrosin Hydroxylase (TH) waren schwach exprimiert, sodass ich zur weiteren Signalverstärkung die ABC-Methode in Kombination mit der TSA unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Tyramid (FITC-Tyramid) gemäß dem kommerziell erworbenen Kit (PerkinElmer, Waltham, MA) anwendete. Hierzu wurden die Schnitte nach Inkubation mit dem primären Antikörper, biotinylierten sekundären Antikörper und Streptavidin-Komplexen für 3x5 min in PBS gewaschen und anschließend für weitere 5 min in Tris-Puffer und der Blockierlösung „Tris-Buffered Saline“ (TNB) blockiert. Anschließend behandelte ich die Schnitte für eine Stunde mit Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP) in TNB. Dieser Schritt diente dazu, den Biotin-Streptavidin Komplex mit dem Enzym SA-HRP zu konjugieren. Zur eigentlichen Signalverstärkung wurden die Schnitte schließlich nach erneutem Waschen für 7-14 min mit einer Mischung aus Amplifikationspuffer, BSA (1:100) und FITC-Tyramid (1:100) behandelt. Katalysiert durch SA-HRP kommt es zur Ablagerung von fluoreszenzmarkiertem Tyramid auf und neben dem Zielantigen, was letztendlich zu der gewünschten Signalamplifikation führt.

Als letzter Färbeschritt tauchte ich alle Gewebeschnitte zur Markierung der Zellkerne in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) oder Hoechst und deckte sie dann mit 0,1 M n-Propylgallat und einem Deckgläschen ab. Gefärbte Schnitte lagerte ich bis zur Mikroskopie bei +4 °C.

2.2.3 Färbung der gesamten Schleimhautblätter

Die gesamten Schleimhautblätter wurden gemäß etablierter Methoden (Holbrook et al., 2011) durch Prof. Holbrook und Peter D. Solomon gefärbt und zur weiteren Analyse freundlicherweise bereitgestellt. Das Färbeprotokoll entspricht fast vollständig dem der Epithelschnitte. Abweichend hiervon erfolgte die Antigenrückgewinnung mit HIER bei einer Temperatur von 90 °C anstelle von 45 °C. Zur Detektion des OEs wurden als primäre Antikörper Maus-Anti-Tuj1 (1:2000) oder Kaninchen-Anti-PGP9.5 (1:7.000) eingesetzt, jedoch

mit deutlich längeren Inkubationszeiten, als bei der Färbung der dünnen Gewebeschnitte, um eine ausreichende Penetration der Antikörper durch die zahlreichen Gewebeschnitte sicherzustellen. Zur Visualisierung der Primärantikörper wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper angewendet mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Farbstoff. Nach der Färbung wurden die Schleimhautblätter mit Gewichten auf Lysin-beschichteten Glasobjektträgern geglättet um die Adhäsion der Gewebeproben auf dem Objektträger zu verbessern. Anschließend wurden die gefärbten Schleimhautblätter mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Nachfolgend wurden die Objektträger mit Xylol gereinigt, mit dem Eindeckmedium DPX (Mischung aus Distyrene, Plasticizer (Trikresylphosphat) und Xylene) eingedeckt und mit einem Objektträger abgedeckt.

Tabelle 1. Färbebedingungen (übersetzt aus Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022))

1° AK	Antigen	Anbieter und Katalog-Nr.	RRID	Spezies	Konzentration der 1° AK + Verstärkung	Markierte Zelltypen	Spezifität
Beta IV tubulin	Synthetisches Peptid	Abcam (ab179509)	AB_2716759	Hase	1:1000 2°	RE	+ (Child et al., 2018)
KI67	Synthetisches Peptid vom C-terminus des menschlichen Ki-67	Epitomics (4203-1)	AB_765010	Hase	1:300 3°	Proliferierende Zellen	+ (Holbrook et al., 2011)
OMP	Aminosäuren 1-163 des gesamten menschlichen OMP	Santa Cruz Biotechnology (sc-365818)	AB_10842164	Maus	1:100 2°	Reife ORNs	+ (Child et al., 2018)
OMP	Rekombinantes Protein in voller Länge	Abcam (ab183947)	AB_2858281	Hase	1:700 2°	Reife ORNs	#
PGP9.5	Humanes PGP9.5-Protein, gereinigt aus pathogenfreiem menschlichem Gehirn	Cedarlane (RA95101)	AB_2313685	Hase	1:7,000 2°	ORNs	+ (Holbrook et al., 2011)
SOX2	Transkriptionsfaktor Sox2	Invitrogen (14-9811-82)	AB_11219471	Ratte	1:300 2°	GBCs, HBCs, Stützzellen	+ (Child et al., 2018)

SOX9	KLH-konjugiert mit der C-terminalen Sequenz von humanem Sox9	Emd Millipore (AB5535)	AB_2239761	Hase	1:100 2°	Kanal- und Drüsenzellen	+ (Holbrook et al., 2011)
TBX21	Synthetisches Peptid in Human T-bet/ Tbx21 aa 1-100 (N-terminal)	Abcam (ab150440)	AB_2889209	Hase	1:500 3° (adult) TSA (fetal)	Mitralzellen	+ (Child et al., 2018)
TBX21	Rekombinantes T-bet der Maus in voller Länge	Abcam (ab91109)	AB_2050371	Maus	1:100 3° (adult) TSA (fetal)	Mitralzellen	#
TUJ1	Mikrotubuli aus Rattenhirn	BioLegend (MMS-435P-250)	AB_2313773	Maus	1:1000 1:2000 (WM) 2°	ORNs	+ (Holbrook et al., 2011)
TH	SDS-denaturierte Ratten-Tyrosin-Hydroxylase (TH)	Invitrogen (P21962)	AB_2539844	Hase	1:1000 3° (adult) TSA (fetal)	Dopaminerge peri-glomeruläre Zellen	#
TH	Gemeinsame Regionen des Tyroxin-Hydroxylase-Genprodukts von Mensch und Maus	Abcam (ab76442)	AB_1524535	Huhn	1:300 3° (adult) TSA (fetal)	Dopaminerge peri-glomeruläre Zellen	#
VGLUT2	C-terminale Region von Maus-VGLUT2, konjugiert mit KLH	Abcam (ab84103)	AB_10674784	Hase	1:500 3°	Synaptische Endigungen der ORNs in den Glomeruli des OBs	#

Abkürzungen: **AK** – Antikörper; **GBCs** – Globale Basalzellen; **HBCs** – Horizontale Basalzellen; **OB** – Olfaktorischer Bulbus; **OMP** – Olfaktorisches Marker Protein; **ORNs** – Olfaktorische Rezeptorneurone; **RE** – Respiratorisches Epithel; **TH** – Thyrosin Hydroxylase; **TSA** – Tyramide Signalverstärkung; **TUJ1** – β -tubulin III; **VGLUT2** – Vesikulärer Glutamat Transporter Typ 2; **WM** – whole mount – ganze Schleimhautblätter; + - Spezifität der Färbung beruhte auf publizierten Daten; # - Spezifität der Färbung basierte auf der bekannten Zelltyp-Expression des Proteins und dem Fehlen des spezifischen Färbemusters bei Entfernung des Antikörpers.

2.3 Mikroskopie

Zur qualitativen Analyse des OEs und OBs wurden die gefärbten Schnitte mit einem konfokalen Mikroskop LSM800 von Zeiss aufgenommen. Zur quantitativen Analyse hinsichtlich verschiedener Parameter des OEs und OBs wurden Mosaikbilder von gefärbten Schnitten mit einem 4fach-Objektiv eines Nikon Microphot-SA Mikroskop (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) und einem motorisierten Objektisch von Ludl (Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY) aufgenommen. Die einzelnen Mosaikbilder wurden anschließend mit einer Retiga-Kamera (Teledyne QImaging, British Columbia, Kanada), der iVision-Aufnahmesoftware (BioVision Technologies Exton PA, iVision–Mac (2020)) und der Stitching-Software Autopano Pro (Kolor / Gopro San Mateo CA, Autopano pro; Version 3.7.0 (2018)) zusammengefügt. Bei allen Bildern wurde lediglich die Balance, der Kontrast und die Ausgewogenheit der Beleuchtung angepasst. Die Bildanalyse und Quantifizierung erfolgte anschließend mit der Software ImageJ (ImageJ; Version 1.50i, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.4 Quantitative Analyse ganzer Schleimhautblätter

Gesamte Schleimhautblätter des Septums und der Seitenwand wurden verwendet, um die Position des OEs im Verhältnis zu bekannten anatomischen Strukturen zu bestimmen, die Fläche des OEs zu ermitteln und mögliche Veränderungen dieser Parameter in Abhängigkeit von Alter und Demenz festzustellen. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Verteilung der olfaktorischen Rezeptorneurone innerhalb des OEs in Abhängigkeit vom Alter oder Demenz verändert. Die Analyse der gesamten Schleimhautblätter erfolgte gemeinsam mit Prof. Holbrook, Parthkumar K. Patel und Brian Lin.

Zur Markierung des OEs innerhalb gesamter Schleimhautblätter, wurden die im OE enthaltenen olfaktorischen Rezeptorneurone mit den neuronalen Marker Tuj1 und PGP9.5 mit DAB als Farbstoff gefärbt. Daraufhin wurde die Fläche des OEs, definiert als der Bereich, der olfaktorische Rezeptorneurone enthält und von einer angrenzenden, kontinuierlichen Schicht respiratorischen Epithels umschlossen ist, quantifiziert. Zur Bestimmung der Position des OEs in der Nasenscheidewand, wurden die gefärbten Schleimhautblätter mit den Resektionsrändern des ursprünglichen Gewebeblocks verglichen und so die Abstände zwischen dem gefärbten Rand des OEs und bekannten anatomischen Orientierungspunkten ermittelt (**siehe Abbildung 7**). Um die Verteilung der olfaktorischen Rezeptorneurone innerhalb des OEs zu untersuchen, wurde der Massenschwerpunkt (neuronaler Schwerpunkt) des OEs ermittelt und in Verhältnis zum geometrischen Zentrum (Flächenschwerpunkt) gesetzt.

Der neuronale Schwerpunkt wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$C_X = \frac{\sum C_{i_x} A_i}{\sum A_i} ; C_Y = \frac{\sum C_{i_y} A_i}{\sum A_i}$$

C_X steht dabei für die gemittelte x-Koordinate des neuronalen Schwerpunkts und C_Y für die gemittelte y-Koordinate des neuronalen Schwerpunkts. C_{i_x} und C_{i_y} stellen jeweils die x- bzw. y-Koordinaten der neuronalen Schwerpunkte der einzelnen Proben dar. A_i entspricht der Fläche des OEs der einzelnen Proben.

Nach Berechnung des neuronalen Schwerpunktes wurde die Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts vom geometrischen Flächenschwerpunkt durch Subtraktion der x- und y-Koordinaten des Flächenschwerpunkts von den x- und y-Koordinaten des neuronalen Schwerpunkts ermittelt. Die resultierenden Differenzen in den x- und y-Koordinaten wurden als Vektoren betrachtet, wobei die Vektorgröße mit dem Satz des Pythagoras berechnet wurde ($a^2 + b^2 = c^2$).

Die Richtung des Vektors ermöglichte die Beschreibung der Ausrichtung des neuronalen Schwerpunkts zur x-Achse des Gewebes (ausgerichtet mit dem posterioren Rand nach links) und wurde mit der folgenden Formel berechnet und in Grad angegeben:

$$\theta = \tan^{-1}\left(\frac{Y}{X}\right)$$

Ein Wert von 0° entspricht dabei einer Ausrichtung des Vektors entlang der x-Achse in anteriorer Richtung, während Werte über 1° bedeuten, dass der neuronale Schwerpunkt gegen den Uhrzeigersinn (posterior) von der x-Achse abweicht (**Abbildung 5**). Entsprechend zeigen Werte von 0° bis 90° und von 270° bis 359° eine Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts nach anterior an, während Werte von 90° bis 270° eine Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts nach posterior anzeigen. In ähnlicher Weise deuten Werte von 0° bis 180° auf eine Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts nach dorsal und Werte von 180° bis 359° auf eine Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts nach ventral hin. Bereiche innerhalb der gesamten Schleimhautblätter, welche im Rahmen der Präparation des Gewebes, der Gewebeverarbeitung oder immunhistochemischen Färbung verletzt wurden, wurden vor oben beschriebener Berechnung aus der Gesamtfläche rausgerechnet.

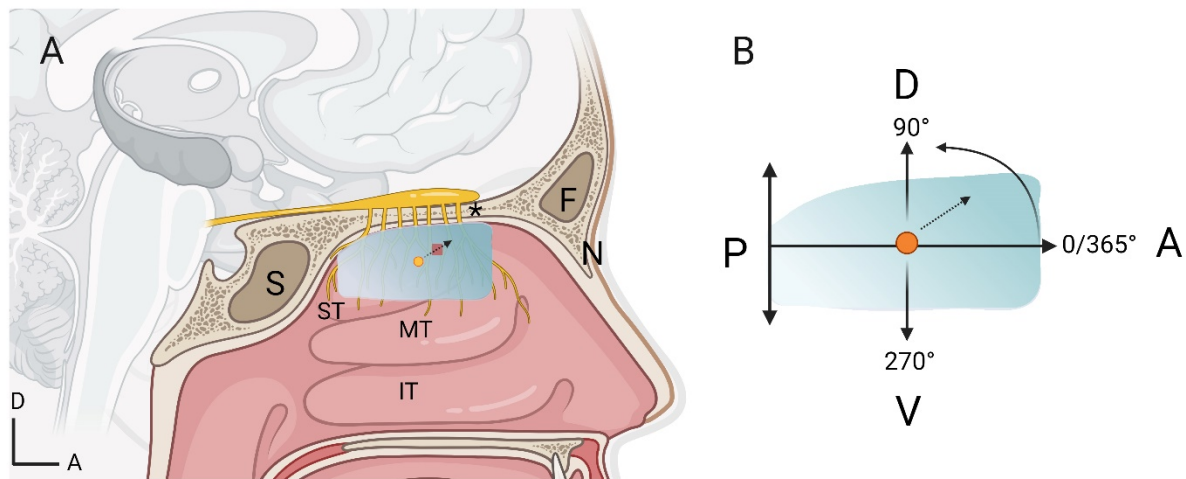
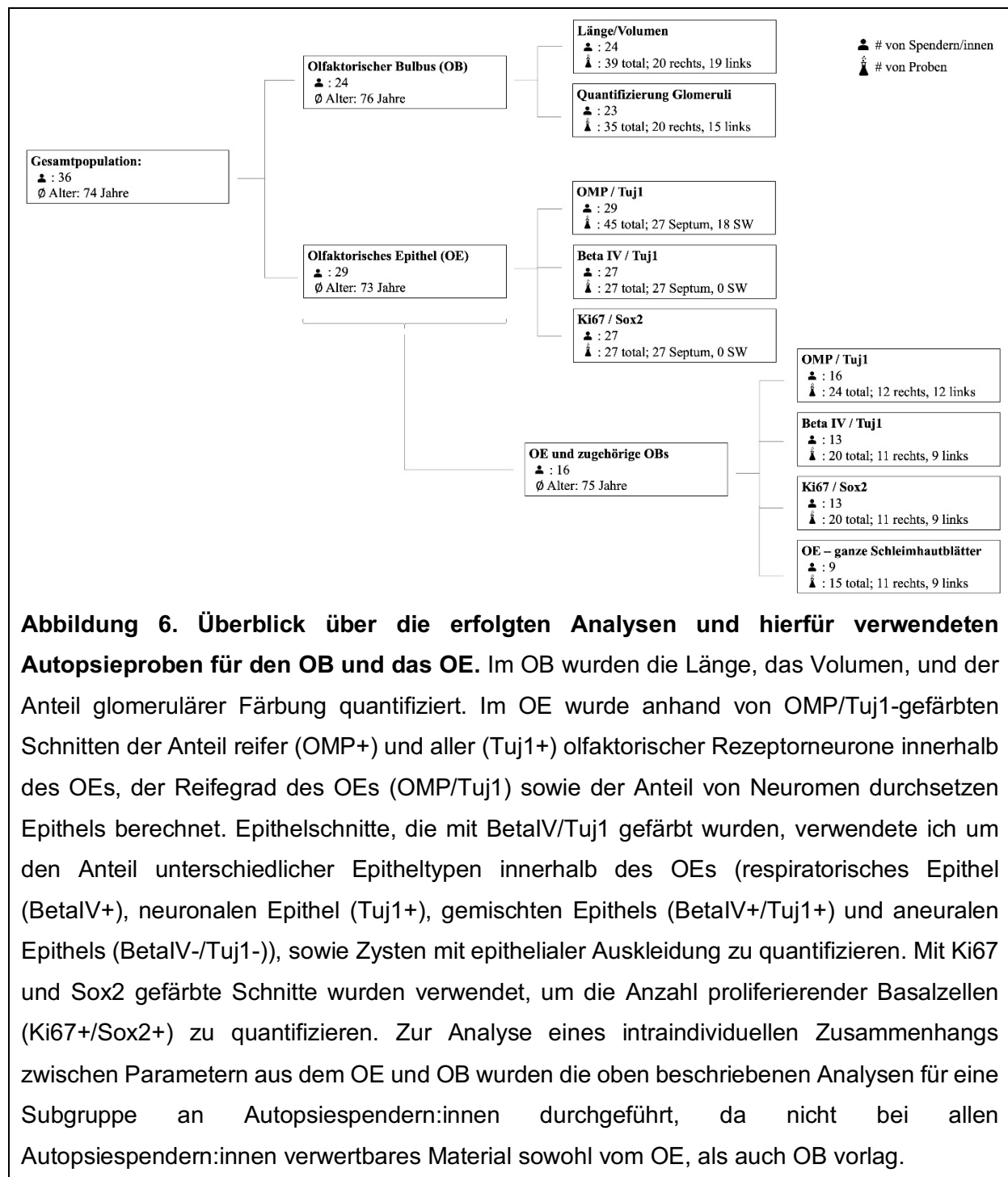


Abbildung 5. Berechnung der Verschiebung des neuronalen Schwerpunkts

A. Schematische Darstellung des OEs (blau-grüne Fläche) innerhalb der Schleimhaut der Seitenwand. Der Farbgradient der OE-Fläche (hellblau – grün) stellt exemplarisch die ungleiche Verteilung der olfaktorischen Rezeptorneurone innerhalb des OEs dar. Der Flächenschwerpunkt wird durch den orangenen Kreis repräsentiert, während der neuronale Schwerpunkt durch das rote Viereck dargestellt wird. Der Pfeil visualisiert die Verschiebung des neuronalen Schwerpunktes zum Flächenschwerpunkt. **B.** Schematische Darstellung der Berechnung der Verschiebung des OEs. Der orangene Punkt entspricht dem Flächenschwerpunkt, der Pfeil zeigt die Richtung der Verschiebung des neuronalen Schwerpunktes vom Flächenschwerpunkt. Werte zwischen 0-90° und 270-359° entsprechen einer Verschiebung nach anterior (**A**), während Werte zwischen 90° und 270° einer Verschiebung nach posterior (**P**) entsprechen. Gleichermaßen entsprechen Werte zwischen 0° bis 180° einer Verschiebung nach dorsal (**D**) und Werte zwischen 180° und 359° eine Verschiebung nach ventral (**V**). (Erstellt mit biorender.com)

2.5 Quantitative Analyse der Gewebeschnitte des OEs und OBs

Ausgewählte Parameter des OEs und OBs quantifizierte ich im Anschluss an die qualitative immunhistochemische Analyse mithilfe einzelner Gewebeschnitte und analysierte sie hinsichtlich Veränderungen zum Alter und Demenz. Bei insgesamt 15 der 36 Spender:innen (5 der 12 Frauen) lag die Diagnose einer Demenz vor, wobei diese bei 6 Spendern:innen weiter spezifiziert wurde (5 Alzheimer, 1 Morbus Parkinson). Aufgrund unterschiedlicher Autopsiebedingungen und variablem Zustand des Gewebes vor und nach dem Färbeprozess konnte ich nicht immer alle anatomischen Bestandteile eines Autopsiepräparates für alle Analysen verwenden. **Abbildung 6** bietet einen Überblick über die erfolgten Analysen und die hierfür verwendeten Autopsieproben.



2.5.1 Gewebeschnitte des olfaktorischen Epithels

Alle Färbungen und quantitativen Analysen an Gewebeschnitten des OEs erfolgten an drei repräsentativen Schleimhautstreifen. Diese wählte ich stets im gleichen Abstand zueinander aus, sodass diese die gesamte dorsoventrale Achse des Riechepithels abdeckten. Auf diese Art und Weise analysierte ich 27 Septum- und 18 Seitenwandschleimhäute von insgesamt 29 Autopsiespendern:innen, soweit vorhanden sowohl von der linken als auch der rechten Seite. Anschließend berechnete ich den Durchschnitt der Ergebnisse der drei OE-Abschnitte für

jeden Datenpunkt. In Fällen, in denen sowohl Septum- als auch Seitenwandproben von beiden Seiten (links und rechts) verfügbar waren, nahm ich den Durchschnittswert beider Seiten sowie von Septum und der Seitenwand, nachdem ich mittels t-Test und einseitiger ANOVA sichergestellt hatte, dass sich die Werte zwischen den Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden. Anschließend untersuchte ich die Ergebnisse auf Unterschiede in Bezug auf Alter und Demenz. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen immunhistochemischen Analysen im Detail vorgestellt werden.

2.5.1.1 Ausmaß des neuronalen Reifegrades und Quantifizierung von Neuomen

Den Reifegrad des OEs bestimmte ich durch den Anteil reifer olfaktorischer Rezeptorneurone an der Gesamtpopulation der olfaktorischen Rezeptorneurone. Hierzu färbte ich die Schnitte mit Antikörpern gegen das olfaktorische Markerprotein (OMP) (Monti-Graziadei et al., 1977), welches lediglich von reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert wird, und Tuj1, das sowohl reife als auch unreife olfaktorische Rezeptorneurone markiert (Holbrook et al., 2011). Anschließend berechnete ich die Gesamtfläche der positiven Färbung für Anti-Tuj1 und Anti-OMP mit der Software ImageJ und setzte sie in Verhältnis zur gemessenen Gesamtlänge des OEs (neuronaler Färbung (%) pro Länge des Gesamt-OEs (mm)). Dabei legte ich als Grenzen des OEs dorsal die Siebbeinplatte und ventral den Übergang zu durchgehendem respiratorischem Epithel fest. Anschließend berechnete ich das Verhältnis der OMP-positiven Färbung zur Tuj1-positiven Färbung und ermittelte so den Reifegradindex.

Zusätzlich nutzte ich die Tuj1-Färbung, um Geflechte dysfunktionaler Nervenfasern, sogenannte Neurome, im OE zu identifizieren. Zur Quantifizierung dieser morphologischen Veränderung im adulten OE berechnete ich den Anteil des Gesamt-OEs, der von Neuomen eingenommen wurde, indem ich die Länge des OEs welches Neurome enthielt durch die Gesamtlänge des OEs dividierte (OE mit Neuomen (mm) / Gesamt-OE (mm)).

2.5.1.2 Gesundheitszustand des olfaktorischen Epithels; Respiratorisches Epithel und subepitheliale Zysten

Zur Beurteilung des neuronalen Gesamtzustands des Gewebes färbte ich OE-Schnitte des rechten und/oder linken Septums von insgesamt 27 Autopsiespendern:innen mit Antikörpern gegen Tuj1 und β -Tubulin IV (BetaIV). Letzteres markiert das Vorhandensein respiratorischen Epithels (Child et al., 2018). Dies ermöglichte neben der Berechnung des Anteils neuronalen OEs, die prozentualen Längen verschiedener metaplastischer Epitheltypen. Dabei unterschied ich: respiratorisches Epithel (BetaIV(+)-Färbung), neurogenes/neuronaes OE (Tuj1(+)-Färbung), aneurales OE (BetaIV(-)/Tuj1(-)-Färbung) und gemischtes Epithel (BetaIV(+)/Tuj1(+)-Färbung).

Außerdem verwendete ich die mit BetalV und Tuj1 markierten Schnitte, um die Anzahl und Art subepithelialer Zysten innerhalb der Lamina propria zu analysieren. Diese teilte ich je nach Färbemuster in neuronale Zysten (Tuj1(+)), respiratorische Zysten (BetalV(+)) und gemischte Zysten (Tuj1(+)/BetalV(+)) ein. Nach der Färbung zählte ich die unterschiedlichen Zystenarten und berechnete die Anzahl pro Gesamtlänge des OEs ($\text{Anzahl Zysten} / \text{Gesamtlänge OE (mm)}$).

2.5.1.3 Epitheliale Regenerationsfähigkeit

Um proliferierende Basalzellen innerhalb des OEs zu quantifizieren, färbte ich OE-Schnitte des rechten und/oder linken Septums von insgesamt 27 Autopsiespendern:innen, welche an die für die OMP/Tuj1- und BetalV/Tuj1-Färbung verwendeten Schnitte angrenzten, mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki67 und den Transkriptionsfaktor Sex Determining Region Y-Box 2 (Sox2). Anschließend zählte ich die sich teilenden Basalzellen und setzte sie ins Verhältnis zur Länge des OEs ($\text{Anzahl teilender Basalzellen} / \text{Gesamtlänge OE (in mm)}$).

2.5.2 Gewebeschnitte der olfaktorischen Bulbi

Die immunhistochemische Analyse des OBs führte ich getrennt für den rechten und linken Riechkolben durch. Es wurden keine Proben ausgeschlossen. Axonfortsätze der olfaktorischen Rezeptorneurone, welche aus der olfaktorischen Peripherie (OE) in den Bulbus projizieren, färbte ich, wie auch im OE, mit Antikörpern gegen OMP. Die Synapsen der olfaktorischen Rezeptorneurone mit Projektionsneuronen zweiter Ordnung innerhalb der Glomeruli visualisierte ich mit Antikörpern gegen den Vesikulären Glutamat Transporter 2 (VGluT2) (Child et al. 2018); (Gabellec et al. 2007). Hierzu verwendete ich insgesamt 39 OBs von 24 Probanden:innen.

2.5.2.1 Bulbuslänge und -volumen

Zur Bestimmung der Bulbuslänge ermittelte ich den Abstand zwischen dem ersten und letzten Gewebeschnitt des OBs, der eine positive Färbung für Glomeruli aufwies (VGluT2(+)). Das Bulbusvolumen errechnete ich, indem ich zunächst die Oberfläche des OBs anhand von sechs repräsentativen, gleichmäßig über den gesamten OB verteilten Gewebeschnitten bestimmte. Die Grenze bildeten auch hier der erste und letzte Gewebeschnitt mit positiver Färbung für Glomeruli. Anschließend multiplizierte ich die Gesamtoberfläche mit dem Abstand zwischen den einzelnen Gewebeschnitten unter Kenntnis der Dicke der Gewebeschnitte und errechnete so das Gesamtvolumen der OBs.

2.5.2.2 Quantifizierung der Glomeruli

Zur Quantifizierung der Glomeruli berechnete ich die Fläche positiver VGlut2-Färbung innerhalb eines Bulbus an 35 Bulbi von 23 Probanden:innen. Hierzu wählte ich pro Bulbus fünf repräsentative, gleichmäßig verteilte Abschnitte innerhalb des Bulbus aus und färbte sie mit VGlut2. Anschließend ermittelte ich die positive VGlut2-Färbefläche mithilfe von Adobe Photoshop (Adobe System Software Ireland Limited, Photoshop 12.0, Dublin, Ireland) und dem Schwellenwert-Tool von ImageJ und setzte sie in Bezug zur Gesamtoberfläche des OBs. Für die auf diese Art und Weise erhobene glomeruläre Fläche der fünf repräsentativen OB-Schnitte ermittelte ich analog zur Analyse der epithelialen Gewebeschnitte den Durchschnitt. Zusätzlich teilte ich die OB-Gewebeschnitte anhand von Mosaikbildern mit Hilfe der Software ImageJ gleichmäßig in eine obere und untere Hälfte und ermittelte so die Fläche positiver VGlut2-Färbung getrennt für die ventrale und dorsale Hälfte des OBs.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mittels IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics ©; Version 23.0, für Mac) und SigmaPlot (Systat Düsseldorf, SigmaPlot; Version 12.0 (2020)). Deskriptive Analysen führte ich für den allgemeinen histologischen Aufbau des OEs und OBs durch. Numerische Variablen werden im Folgenden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

Bei der Untersuchung vollständiger Schleimhautblätter wurde ein zweiseitiger t-Test bei normalverteilten Werten (überprüft mit dem Shapiro-Wilk-Test) angewendet, während bei Abweichungen von der Normalität ein Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test) eingesetzt wurde. Hinsichtlich der Ermittlung der OE-Fläche in Abhängigkeit vom Alter wurde eine multilinare Regressionsanalyse durchgeführt, wobei Demenz und Alter als unabhängige Faktoren festgelegt wurden.

Verschiedene OE- und OB-Parameter, die im Rahmen der Färbung einzelner Epithelschnitte erhoben wurden, untersuchte ich hinsichtlich einer Korrelation mit dem Alter mittels linearer Regressionsanalyse. Angesichts der bekannten Auswirkungen von Demenz auf den Geruchssinn und der Korrelation von Demenz mit dem Alter überprüfte ich zuvor systematisch, ob eine Demenzdiagnose altersbedingte Unterschiede beeinflussen könnte. Zur Evaluation eines signifikanten Zusammenhangs zwischen verschiedenen OE- und OB-Parametern und Demenz oder Geschlecht führte ich einen ungepaarten t-Test durch. Ergebnisse werden im Folgenden als Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ($\pm$), p-Wert (p) und der Spannweite (min-max) berichtet. Für Analysen, die den Levene-Test auf Varianzgleichheit nicht bestanden, verwendete ich den Welch-Test anstelle eines t-Tests. In Anbetracht der

Tatsache, dass die Bulbi neuronal vollständig voneinander getrennt sind und der linke OB ausschließlich mit dem linken OE interagiert, behandelte ich den linken und den rechten Bulbus als separate Proben. Ausgenommen hiervon sind Analysen der Korrelation mit dem Alter. In diesem Fall wurden die OB-Parameter für den rechten und linken Bulbus gemittelt. Bevor ich Untergruppen wie beispielsweise Werte des Septums und der Seitenwand zusammenfasste, stellte ich mittels One-Way-ANOVA oder t-Test sicher, dass die Gruppen nicht signifikant voneinander abwichen. Zur Analyse eines direkten Zusammenhangs neuronaler Parameter des OEs und der dazugehörigen OBs innerhalb eines:er Autopsiespenders:in, erfolgte eine lineare Regressionsanalyse.

Die Abbildungen erstellte ich mit der PRISM-Software (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, Prism; Version 8.4.3 für Mac, www.graphpad.com), Adobe Photoshop (Adobe System Software Ireland Limited, Photoshop 12.0, Dublin, Ireland) und biorender.com (BioRender (2020) Toronto, Ontario; URL: [<https://app.biorender.com/>]).

3 Ergebnisse

Der folgende Abschnitt befasst sich ausführlich mit den wissenschaftlichen Ergebnissen, die im Journal of Comparative Neurology publiziert wurden.

Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E., & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. Journal of Comparative Neurology, 1–22.

Tabelle 2. Autopsiespender.innen (übersetzt aus Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022))

Spender:in	Ursprung	Gewebe	Alter [Y]	Geschlecht	Todesursache	Begleiterkrankungen
07-08032	NDRI	OB, OE	75	M	Alzheimer	Emphysem, Nikotinabusus
07-08073	NDRI	OB, OE	85	F	Alzheimer	Arthritis, CVE, AHTN
07-09010	NDRI	OE	78	M	KAK	Nikotinabusus, Pulmonary artery Erkrankung
07-12056	NDRI	OE	70	M	Alzheimer	Arthritis, zerebrale Kinderlähmung, Epilepsie, aHTN
08-01034	NDRI	OE	75	M	Lungenkrebs	Arthritis, Emphysem, aHTN, TIA
08-01041	NDRI	OE	78	F	Demenz	CVE, Epilepsie, aHTN
08-01056	NDRI	OB	69	M	Parkinson	Nierensteine
08-02048	NDRI	OB	90	M	CVE	Alkoholabusus, MI
08-06004	NDRI	OB, OE	87	M	“Altersschwäche”	Arthritis, Demenz, Epilepsie, Herzschrittmacher
08-06020	NDRI	OB, OE	82	F	DHI	Arthritis, Kardiomyopathie, MI, Pneumonie
08-06069	NDRI	OB	77	M	CVE	Nikotinabusus, Pneumonie
08-07007	NDRI	OE	66	F	Leberversagen	Lebertransplantation, NIDDM, Lungenentzündung
08-08026	NDRI	OE	89	F	Darmperforation	DHI, AHTN, TIA
08-08061	NDRI	OB, OE	96	F	Demenz	Arthritis, Metastasen im Darm, aHTN, Nikotinabusus
08-12002	NDRI	OE	80	M	Pneumonie	CAD, Demenz
09-02047	NDRI	OB, OE	49	M	Hirntumor	aHTN, Depression
09-04005	NDRI	OB, OE	67	F	Lungenkrebs	Nikotinabusus, Vaskuläre Erkrankung
10-08058	NDRI	OB, OE	62	M	DHI	aHTN, Gastrointestinale Ulzeration, MI, Nikotinabusus, Reflux

10-09032	NDRI	OB, OE	72	M	DHI	COPD, Emphysem, DM, aHTN, TIA, Nieren-Karzinom
11-05019	NDRI	OB, OE	73	M	Lungenkrebs	Arthritis, CAD, aHTN, pulmonale Metastasen, Nikotinabusus
11-06002	NDRI	OB, OE	68	M	ALS	Depression, aHTN, Nikotinabusus, Melanom der Haut
11-06054	NDRI	OE	71	M	Lungenkrebs	Divertikulitis, Nikotinabusus, Prostata-Karzinom
11-06062	NDRI	OE	59	F	Malignes Melanom	Asthma, DHI, Depression, aHTN, Metastasen
11-07033	NDRI	OE	71	F	Demenz	Arthritis, Depression, GERD, Gicht, aHTN, Osteoporose, Ulcera
11-07034	NDRI	OB, OE	67	M	Lungenkrebs	Metastasen, NIDDM, Nikotinabusus
11-07060	NDRI	OB, OE	66	M	Herzinsuffizienz	DHI, Alkoholabusus, MI, Nikotinabusus, RA, GERD
11-08018	NDRI	OB, OE	86	F	Alzheimer	Arthritis, DM Typ 1, aHTN, leichter Alkoholabusus, Nikotinabusus, Nierenversagen
11-08047	NDRI	OB, OE	74	M	CVE/Schlaganfall	Bradykardie mit Pacer, Demenz, Hüftfraktur, moderater Alkoholabusus, Nikotinabusus, Paralyse, Lungentzündung
11-09008	NDRI	OB, OE	81	M	Demenz	DM Typ 2, aHTN, MI, Osteoarthritis
11-12010	NDRI	OB	69	F	“Alterschwäche”	Vorhofflimmern, Zerebrales Aneurysma, CVE, aHTN, Schlaganfall
11-12037	NDRI	OB, OE	80	M	DHI	DHI, CVE, DM Typ 1, Alkoholabusus, MI, Nikotinabusus
12-01063	NDRI	OB	92	M	Kardiovaskuläre Erkrankung	Demenz, Depression, Nikotinabusus

12-02035	NDRI	OB	81	M	Demenz	Darmresektion, Demenz, Depression
12-02054	NDRI	OE	74	F	Metastasierter Lungenkrebs	Zerebrale Metastase, Nikotinabusus, GERD
12-06054	NDRI	OE	80	M	Alzheimer	Arthritis, CVE, GERD, Pneumonie, Hydrozephalus
12-080313	AGR	OE	28	M	Demyelinisierende Erkrankung	Diabetes insipidus, Hörverlust, Multiple Sklerose, Paraplegisch, epileptische Anfälle
9993	ABR	OB, OE	23 GW	M		
6167	ABR	OE	22 GW	M		

Abkürzungen: **ABR** – Advanced Bioscience Resources Incorporation; **AGR** – Anatomy Gifts Registry, Hanover, MD, Alameda, CA; **ALS** – Amyotrophe Lateralsklerose; **aHTN** – arterielle Hypertonie; **COPD** – Chronic Obstructive Lungenerkrankung; **CVE** – cerebrovaskuläres Ereignis; **DHI** – dilatative Herzinsuffizienz; **DM** – Diabetes Mellitus; **GERD** – Gastroesophageal reflux Erkrankung; **GW** – Gestationswoche; **KHK** – Koronare Herzerkrankung; **MI** – Myokardinfarkt; **NDRI** – National Research Interchange, Philadelphia, PA; **NIDDM** – non insulin-dependent Diabetes Mellitus; **RA** – Rheumatoide Arthritis; **TIA** – Transiente Ischämische Attacke

3.1 Das olfaktorische Epithel

3.1.1 Die anatomische Lage des olfaktorischen Epithels

Im embryonalen Gewebe imponierte die Fläche des OEs als eine dicht gefärbte, zusammenhängende Schicht olfaktorischer Rezeptorneurone und zeichnete sich durch glatt begrenzte Ränder zum respiratorischen Epithel aus (**Abbildung 7**). In erwachsenen Schleimhautblättern erschien das OE sehr viel heterogener. Häufig war der Übergang vom OE zum respiratorischen Epithel unregelmäßig und die neuronale Schicht durch Bereiche mit wenigen oder gar keinen olfaktorischen Rezeptorneuronen unterbrochen (**Abbildung 7**). Diese Bereiche waren entweder durch Mikrovilli besetzte Stützzellen oder metaplastisches respiratorisches Epithel ersetzt, welches säulenförmige Flimmerzellen enthielt, und Ähnlichkeiten mit dem übrigen respiratorischen Epithel der Riechschleimhaut aufwies. Der definierte Bereich des OEs schloss in adulten Proben dementsprechend nicht nur Anteile mit olfaktorischen Rezeptorneuronen ein, sondern beinhaltete auch Bereiche, welche metaplastisch umgewandelt waren. Im Durchschnitt erstreckte sich die OE-Fläche in adulten Proben an der Seitenwand 1 cm unterhalb der Siebbeinplatte, 0,7 cm hinter dem vorderen Ansatz der mittleren Nasenmuschel, 1,7 cm über dem unteren Rand der mittleren Nasenmuschel und 0,4 cm vor der Keilbeinfläche (**Abbildung 7**). Das OE des Septums spiegelte im Wesentlichen die Grenzen der Seitenwand wider, wobei es durchschnittlich sowohl in der rechten als auch linken Nasenhöhle etwas kleiner war als in der Seitenwand ($1,37 \text{ cm}^2$ vs. $1,72 \text{ cm}^2$, $p=0,04$). In keinem der Präparate fanden sich olfaktorische Rezeptorneurone am vorderen Rand der mittleren Nasenmuschel. In embryonalen Proben war das OE vergleichbar zu den adulten Proben in einem Bereich unterhalb der Siebbeinplatte lokalisiert, beschränkte sich aber meist auf den Bereich der oberen Nasenmuschel. Der vordere Rand der embryonalen OE-Fläche lag in der Regel hinter der mittleren Nasenmuschel.

3.1.2 Veränderungen des olfaktorischen Epithels in Abhängigkeit vom Alter

Der Verlust olfaktorischer Rezeptorneuronen innerhalb des OEs und das Vorkommen metaplastisch umgewandelter Bereiche innerhalb des adulten OE ist bereits qualitativ beschrieben (siehe Einleitung 1.4.1). Um diese Beobachtung zu quantifizieren, untersuchte ich, ob die Fläche des OEs innerhalb der Schleimhautblätter des Septums und der Seitenwand in Abhängigkeit vom Alter variiert (**Abbildung 7**). Unabhängig von einer möglichen Demenzdiagnose fand ich mit zunehmendem Alter eine Abnahme der OE-Fläche in Schleimhautblättern des Septums ($p=0,03$, $r^2=0,37$) sowie eine Tendenz zur Abnahme der OE-Fläche in Schleimhautblättern der Seitenwand ($p=0,77$, $r^2=0,36$) (**Abbildung 7**). Berechnete man die Werte von Autopsiespendern:innen mit Demenz getrennt, ergab sich weder für das

Septum noch die Seitenwand ein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter ($p = 0,722$, Septum; $p = 0,142$, Seitenwand). Wie bereits erwähnt, umfasste die definierte Fläche des OEs auch Bereiche, die metaplastisch verändert waren und kein neuronales Epithel mehr enthielten. Darüber hinaus wurden die gefärbten Schleimhautblätter hinsichtlich Veränderungen in der Anzahl olfaktorischer Rezeptorneurone innerhalb des OEs als Funktion des Alters untersucht. Hierzu wurde der Anteil des OEs berechnet, der positiv für die neuronalen Marker PGP9.5- oder TUJ1 färbte, was im Folgenden als Anteil des verbleibenden OEs bezeichnet wird. In der multilinenaren Regressionsanalyse wurde mit zunehmendem Alter in Analysen des Septums ($p=0,002$, $r^2=0,85$) als auch der Seitenwand ($p=0,002$, $r^2=0,85$) eine Abnahme des Anteils verbleibenden OEs identifiziert (**Abbildung 7C**). Berechnete man die Werte von Autopsiespendern:innen mit Demenz getrennt, zeigte sich der Anteil des verbleibenden OEs vom Septum ($p < 0,001$) ebenfalls reduziert, nicht aber der von der Seitenwand ($p = 0,071$).

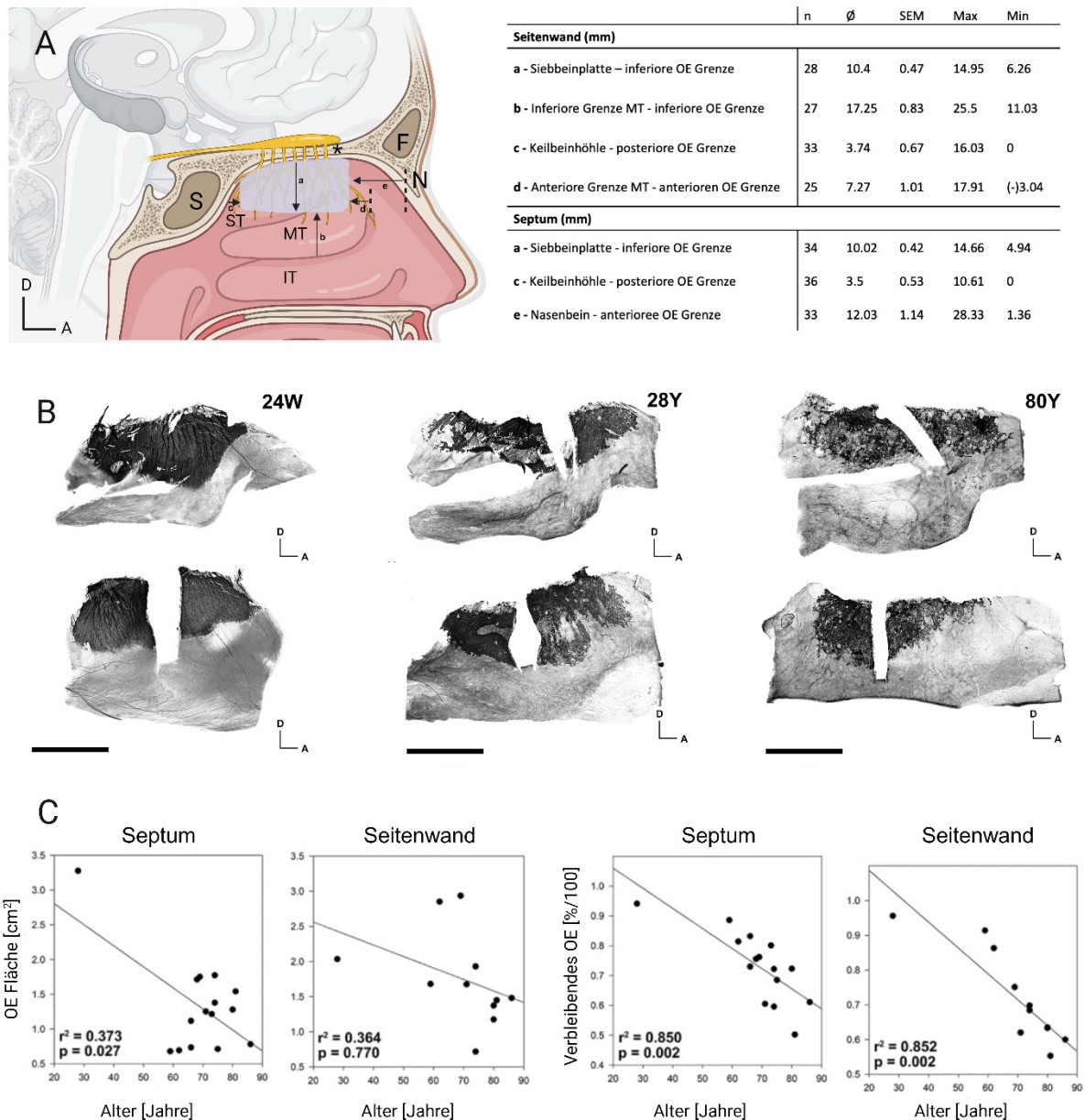


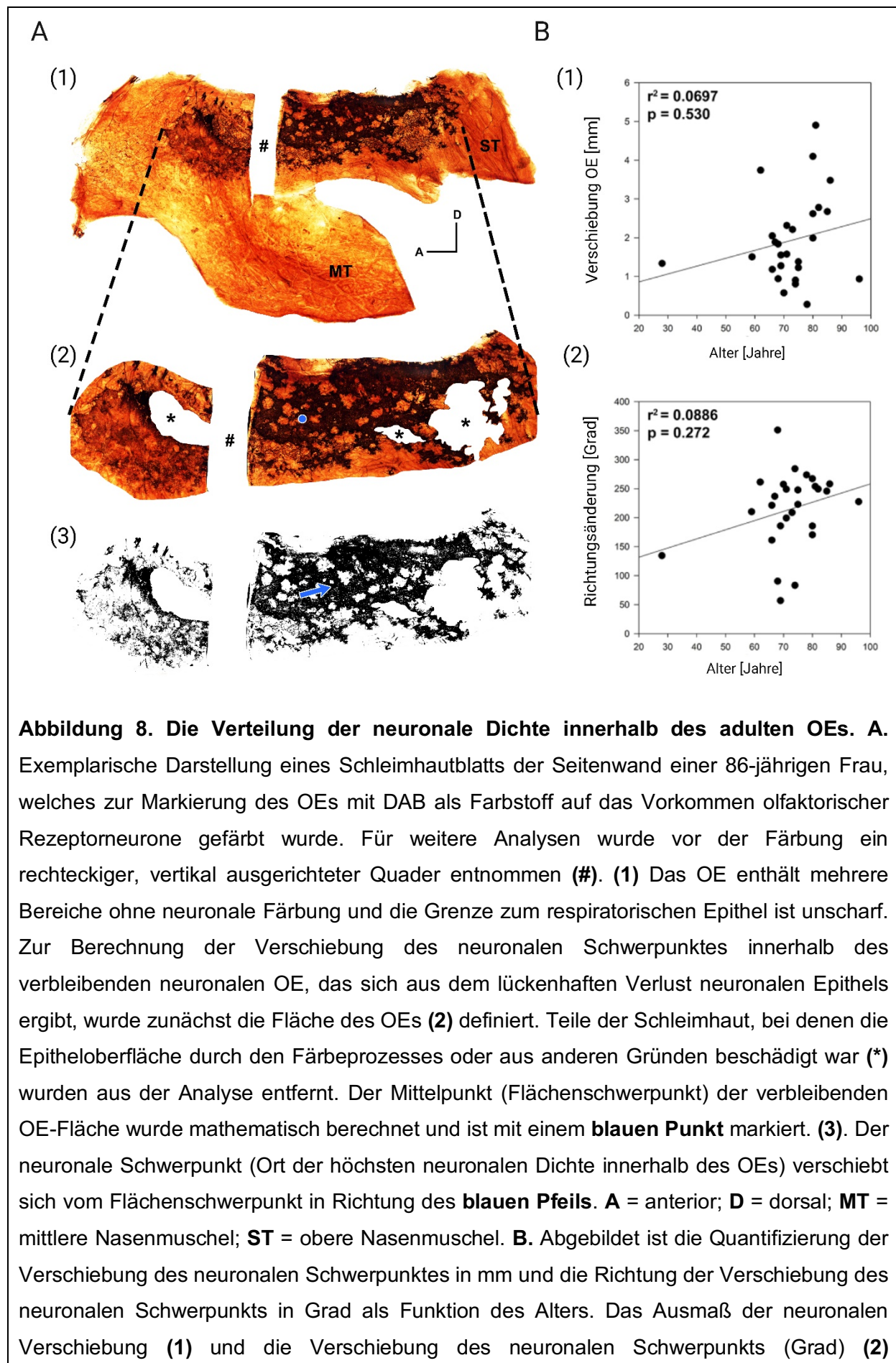
Abbildung 7. Anatomische Lage des menschlichen OE und Veränderungen im Alter.

A. Schematische Darstellung der Lage des OEs (**blaue Fläche**) direkt unterhalb der Siebbeinplatte (*) im Verhältnis zu anatomischen Landmarken (**F** = Stirnhöhle; **N** = Nasenbein; **S** = Keilbeinhöhle; **IT** = inferiore Nasenmuschel; **MT** = mittlere Nasenmuschel; **ST** = obere Nasenmuschel). Die **Pfeile** repräsentieren Abmessungen für die Flächenberechnung des OEs, deren Durchschnittswerte in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt sind (**a** = Abstand von der Siebbeinplatte zur unteren Begrenzung des OEs; **b** = Abstand von der unteren Begrenzung der mittleren Nasenmuschel zur unteren Begrenzung des OEs; **c** = Abstand von der Stirnseite der Keilbeinhöhle zur hinteren (posterioren) Begrenzung des OEs; **d** = Abstand von der vorderen Befestigung der mittleren Nasenmuschel zur vorderen Begrenzung des OEs; **e** = Abstand von der Unterseite des Nasenbeins zur vorderen Begrenzung des OEs). **B.** Exemplarische Darstellung von Tuj1-gefärbten Schleimhautblättern der Seitenwand (**obere**

Reihe) und des Septums (**untere Reihe**) aus der rechten Nasenhöhle eines menschlichen weiblichen Embryos in der 24. Schwangerschaftswoche, eines 24-jährigen Mannes und eines 80-jährigen Mannes. Das OE des Embryos zeigt eine durchgehend homogene Schicht neurogener Färbung und eine klare Grenze zwischen dem dunkel gefärbten OE und respiratorischen Epithel (RE) (**Maßstab 5mm**). Im Vergleich dazu zeigt das OE des 28-jährigen Mannes eine unregelmäßige Grenze zwischen OE und RE. Außerdem fallen vermehrt Bereiche ohne intensive neurogene Färbung auf. Mit zunehmendem Alter scheint die Grenze zwischen dem OE und RE unregelmäßiger zu werden und die Anzahl der Bereiche ohne intensive neurogene Färbung zuzunehmen (**Maßstab für die adulten Schleimhautblätter = 10 mm**). **C.** Abgebildet sind Berechnungen zur Fläche des OEs und Anteil des neuronenhaltigen Epithels innerhalb der definierten OE-Fläche (verbleibendes OE) in Abhängigkeit vom Alter. **C1.** Die Fläche OEs nimmt in gesamten Schleimhautproben des Septums, nicht aber der Seitenwand signifikant mit zunehmendem Alter ab. Sowohl im Septum als auch Seitenwand nimmt der Anteil positiver neuronaler Färbung (verbleibendes OEs) innerhalb der Fläche des OEs mit zunehmendem Alter ab. **A** = anterior; **D** = dorsal. (*Adaptiert von Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022); erstellt mit biorender.com*)

3.1.3 Verschiebungen der neuronalen Dichte innerhalb des olfaktorischen Epithels in Abhängigkeit vom Alter

Um festzustellen, in welchem Bereich des OEs der Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone am prominentesten ist, wurde der neuronalen und Flächen-Schwerpunkt des OEs bestimmt und die Verschiebungen der beiden Größen zueinander analysiert (siehe Einleitung 1.6 und Methoden 2.4) (**Abbildung 8**). Im Durchschnitt über alle adulten Schleimhautproben des Septums wurde eine Verschiebung des neuronalen Schwerpunktes um $2,14 \text{ mm} \pm 0,30 \text{ mm}$ in die Richtung von $146,14^\circ \pm 11,66^\circ$ (**Abbildung 8**), also nach posterior und dorsal (d. h. in diesem Bereich neuronal dichter) beobachtet. In Abhängigkeit von Alter oder Demenz ergab sich kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 8**).



unterscheidet sich nicht im Alter (*Adaptiert von Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022); erstellt mit biorender.com*).

3.1.4 Charakterisierung des olfaktorischen Epithels

Zur tiefergehenden Analyse histopathologischer Veränderungen des OEs mit zunehmendem Alter erfolgte im Anschluss an die Analyse ganzer Schleimhautblätter eine detaillierte immunhistochemische Untersuchung des OEs an einzelnen Epithelschnitten (siehe Einleitung 1.6 und Methoden 2.5).

Zuvor musste eine histologische Grundlage dafür geschaffen werden, wie das erwachsene menschliche OE aufgebaut ist, und geeignete Parameter für eine quantitative Analyse identifiziert werden. Dazu untersuchte ich Schnitte aus erwachsenen menschlichen OEs unterschiedlicher Altersgruppen, welche ich zuvor mit Antikörpern gegen zellspezifische Marker und Transkriptionsfaktoren gefärbt hatte, zunächst qualitativ und verglich sie mit Proben fetalen OEs (**Abbildung 9**).

3.1.4.1 Qualitative Analyse des menschlichen Riechepithels im Vergleich zum Embryo

Sowohl das adulte als auch embryonale menschliche OE zeigte das aus Nagetieren bekannte, charakteristische, pseudostratifizierte säulenförmige Epithel. Dieses umfasste: die im Zentrum liegende Schicht reifer und unreifer olfaktorischer Rezeptorneurone (Tuj1+, +/- OMP+), die apikal zu den olfaktorischen Rezeptorneuronen liegenden Mikrovilli-besetzten Stützzellen (Sox2+), die basal liegenden Stammzellen (Sox2+ und ggf. p63+) sowie die Bowman-Drüsen (Sox9+) und deren Kanälen (**Abbildung 9A**).

Die zentral gelegene Schicht der olfaktorischen Rezeptorneurone setzte sich aus mehreren Reihen zusammen und erschien im embryonalen OE stets etwas dicker ausgeprägt als die dickste und am gesündesten aussehende Schicht olfaktorischer Rezeptorneurone im adulten Gewebe (**Abbildung 9A-1/2**). Innerhalb der Schichten nahm der Reifegrad der Neurone von basal nach apikal zu. Im Vergleich zu OEs aus Nagetieren war diese Aufteilung zwischen unreifen und reifen olfaktorischen Rezeptorneuronen jedoch weniger strikt. Wie bereits in der Analyse der gesamten Schleimhautblätter aufgefallen und in anderen immunhistochemischen Analysen menschlichen Gewebes beschrieben (siehe Einleitung 1.4.1), war das adulte OE regelhaft von Regionen ohne olfaktorische Rezeptorneurone (aneurales Epithel) oder durch respiratorische Zellen (metaplastisches respiratorisches Epithel - RE), identifiziert durch Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen β -Tubulin IV (BetaIV) durchsetzt (**Abbildung 9B**). Solche Veränderungen fanden sich nicht in Regionen embryonalen OEs. Apikal zur Schicht olfaktorischer Rezeptorneurone lag sowohl im adulten als auch embryonalen Gewebe, eine

Palisade von Stützzellen, markiert mit Antikörpern gegen Sox2 (**Abbildung 9A-3**). Die epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen (HBCs und GBCs), ebenfalls markiert mit Sox2, lagen, wie in Nagetieren kurz oberhalb der Basallamina des OEs (**Abbildung 9A-3**). Sox2 positive Stützzellen und Sox2 positive Basalzellen konnten durch ihre charakteristische Lage voneinander unterschieden werden. Die adulten HBCs waren dabei in einer kontinuierlichen Reihe entlang der Basallamina angeordnet und mitotisch ruhend (Ki67-). GBCs fanden sich apikal zu den HBCs, waren in kleinen Grüppchen angeordnet und färbten sich häufig als Zeichen der aktiven Proliferation positiv für den Proliferationsmarker Ki67. In fetalem Gewebe war die Schicht der basalen HBCs diskontinuierlich und auch die GBCs fanden sich nur unregelmäßig und vereinzelt oberhalb der GBCs. In der Lamina propria identifizierte ich Bowman-Drüsen, markiert mit dem Antigen Sox9, wobei sich gelegentlich Drüsenzellen sowohl im fetalen, als auch adulten Gewebe bis ins Epithel erstreckten (**Abbildung 9A-4**).

3.1.4.2 Verfassung des OEs in Abhängigkeit von Alter und Demenz

Zur Quantifizierung der neuronalen Verfassung des OEs bestimmte ich, wie ausführlich in Methodenteil ausgeführt (siehe Methoden 2.5), den prozentualen Anteil Tuj1(+)-olfaktorischer Rezeptorneurone (Gesamt-neuronalen Epithel) und OMP(+)-olfaktorischer Rezeptorneurone (ausgereiftes neuronales Epithel) am Gesamt-OE (**Abbildung 9B/9D**). Anschließend errechnete ich aus dem Verhältnis reifer olfaktorischer Rezeptorneurone (OMP(+)) zur Gesamtpopulation der olfaktorischen Rezeptorneurone (Tuj1(+)) den Reifegradindex. Für Epithelproben aus dem Septum ergab sich mit zunehmendem Alter kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorkommens olfaktorischer Rezeptorneurone im Allgemeinen (Tuj1+), reifer olfaktorischer Rezeptorneurone (OMP+) oder dem Reifegradindex. Die Analyse der Epithelschnitte der Seitenwand hingegen ergab mit zunehmendem Alter eine signifikante Abnahme sowohl vom gesamten neuronalen Epithel ($p = 0,015$, $r^2 = 0,32$) als auch vom ausgereiften neuronalen Epithel ($p = 0,002$, $r^2 = 0,47$). Der Reifegradindex zeigte einen Trend zur Abnahme (Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone), der Unterschied war jedoch statistisch gesehen nicht signifikant ($p = 0,12$, $r^2 = 0,14$). Nach Bestimmung des Durchschnitts der Werte der Untergruppen Septum und Seitenwand ergab sich mit zunehmendem Alter lediglich noch eine signifikante Abnahme im Anteil ausgereifter olfaktorischer Rezeptorneurone am Gesamt-OE ($p=0,02$, $r^2=0,18$; LR) (**Abbildung 9C**). Für keinen der drei beschriebenen Parameter fand sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf Demenz, unabhängig davon, ob die Werte vom Septum oder der Seitenwand stammten (**Abbildung 9E**).

Um neben dem Verlust neurogenen Epithels das Ausmaß der metaplastischen Degeneration als Funktion des Alters zu quantifizieren, bestimmte ich an Schleimhautproben des Septums neben dem prozentualen Anteil neuronalen OEs (Tuj1+), die Anteile respiratorischen Epithels

(BetaIV+), gemischt neuronal-respiratorischen Epithels (BetaIV+ und Tuj1+) sowie aneuralen Epithels (BetaIV- und Tuj1-) (siehe Methoden 5.1). Hier identifizierte ich eine signifikante Zunahme des gemischten Epithels mit zunehmendem Alter ($p = 0,01$, $r^2 = 0,22$; LR) (**Abbildung 9D**). Der prozentuale Anteil respiratorischen oder aneuralen Epithels am Gesamt-OE unterschied sich nicht in Abhängigkeit vom Alter. Für keinen der beschriebenen Parameter ergab sich eine signifikante Korrelation in Bezug auf Demenz.

3.1.4.3 Regenerationsaktivität in Abhängigkeit von Alter und Demenz

Zur Untersuchung der Regenerationsfähigkeit des OEs zählte ich die Ki67(+)/Sox2(+) teilenden basalen Stammzellen in Epithelstreifen des Septums von 27 Autopsiespendern/innen (siehe Methoden 5.1). Numerisch enthielten Epithelien mit zunehmendem Alter weniger teilende Basalzellen, wobei das statistische Signifikanzniveau knapp verfehlt wurde ($p = 0,06$, $r^2 = 0,14$; LR) (**Abbildung 9F**). Die Anzahl der sich teilenden Basalzellen unterschied sich nicht signifikant in Bezug auf Demenz.

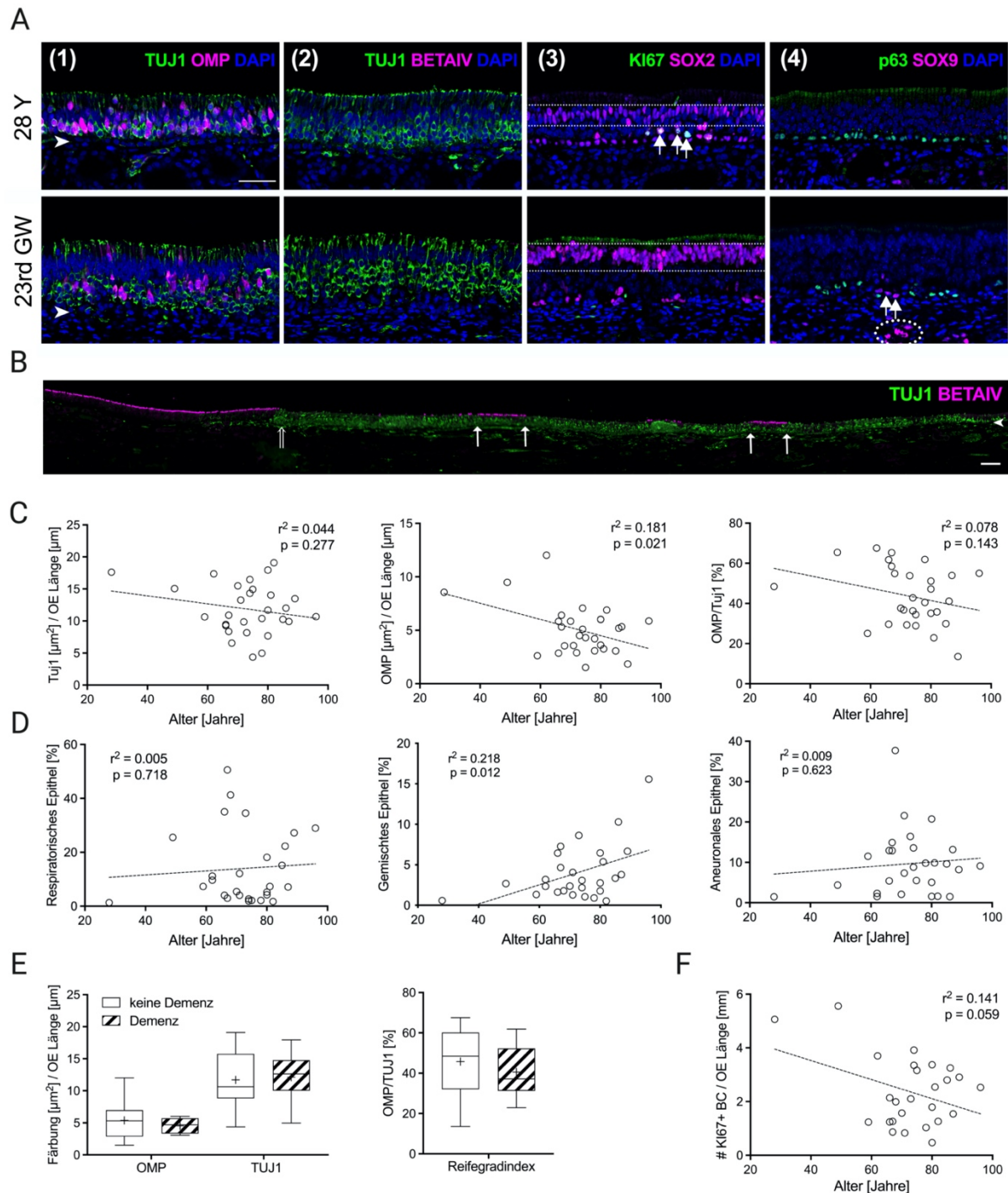


Abbildung 9. Histologische Analyse des OEs und seinen Veränderungen im Alter an Epithelschnitten. A. Vergleich von gesundem adulten OE eines 28-jährigen Mannes (**oben**, #12-080313) und embryonalem OE eines männlichen Embryos aus der 23. Schwangerschaftswoche (**unten**, #6167). (**a**) Beide OEs zeigen ein pseudostratifiziertes, säulenförmiges, neuronales Epithel mit reichlich TuJ1(+) olfaktorischen Rezeptorneuronen (**grün**). Die Nervenschicht fällt im Epithel des Embryos etwas dicker aus. Reife olfaktorische Rezeptorneurone sind mit OMP (**rot**) angefärbt. (**b**) Respiratorische Metaplasie, die mit Antikörpern gegen β -Tubulin IV (BetaIV, magenta) angefärbt wurde, ist in Regionen des

gesunden adulten OEs und allen embryonalen OE-Schnitten nicht vorhanden, tritt aber häufig in adulten OE auf (**siehe B**). **(c)**. Horizontale Basalzellen (HBCs), globale Basalzellen (GBCs) und Stützzellen wurden mit Antikörpern gegen Sox2 (**magenta**) visualisiert. Sowohl in adulten als auch in embryonalen Schnitten sind die HBCs entlang der Basallamina lokalisiert und in der Regel mitotisch inaktiv (Ki67(-) **grün**). Sox2(+) GBCs, liegen direkt über den HBCs (**Pfeile**), proliferieren aktiv und sind im adulten Gewebe oft in kleinen Gruppen angeordnet. Im embryonalen Gewebe sind teilende Basalzellen selten zu finden. Sowohl in adultem als auch embryonalen OE befinden sich im apikalen Teil des OEs eine Palisade von Stützzellkernen (**gestricheltes Rechteck**). **(d)**. Zur genaueren Analyse der HBCs wurden HBCs zusätzlich mit Antikörpern gegen p63 (**grün**) visualisiert. Im adulten OE erscheinen die HBC in Form einer gleichmäßigen Schicht entlang der Basalmembran. Diese ist im fetalen Gewebe diskontinuierlich. Sox9(+)-Gang-/Drüsenzellen (**magenta**) sind sowohl in gesundem erwachsenen, als auch in fetalem OE in der Lamina propria lokalisiert (**gepunkteter Kreis**). Die zugehörigen Gangzellen durchziehen zum Teil die Basallamina (**Pfeile**). Maßstab = 50 µm. **B**. Mosaikbild eines 81-jährigen Mannes (#11-09008, linkes Septum) repräsentativ für die Heterogenität verschiedener Epitheltypen innerhalb des OEs adulter Proben zeigt neben neuronalem OE (Tuj1(+)-Neuronen (**grün**)) Bereiche mit respiratorischer Metaplasie (Beta-IV(+) (**magenta**)) und gemischtem Epithel (Tuj1(+), Beta-IV (+), **Grenzen durch Pfeile definiert**). Der Übergang von OE in kontinuierliches respiratorisches Epithel ist auf der linken Seite zu sehen (**offener Pfeil**). Maßstab = 100 µm. **C**. Abgebildete Analysen entsprechen den Durchschnitt der Werte aus Schleimhautproben des Septums und der Seitenwand und stellen den Anteil aller (Tuj1(+)) und reifer (OMP(+)) olfaktorischer Rezeptorneurone sowie den Reifegradindex (OMP/Tuj1) als Funktion des Alters dar. Anzahl der reifen olfaktorischen Rezeptorneurone nimmt signifikant mit dem Alter ab. **D**. Abgebildet sind die Anteile metaplastisch veränderter Epitheltypen am Gesamt-OE (Septum, n=28) als Funktion des Alters: respiratorisches Epithel (Beta-IV(+)/Tuj1(-)), gemischtes Epithel (Beta-IV(+)/Tuj1(+)) und aneuronales Epithel (BetaIV(-)/Tuj1(-)). Der Anteil gemischten Epithels am Gesamt-OE korreliert signifikant mit zunehmendem Alter. **E**. Abgebildete Analysen entsprechen dem Durchschnitt der Werte, die aus Schleimhautproben des Septums und der Seitenwand erhoben wurden. Der Gesamtanteil olfaktorischer Rezeptorneurone (Tuj1(+)), reifer olfaktorischer Rezeptorneurone (OMP(+)) und der Reifegradindex war unabhängig von der Diagnose einer Demenz. **F**. Abgebildet ist die durchschnittliche Anzahl der sich teilenden Ki67(+)/SOX2(+)-Basalzellen, welche an drei Epithelschnitten aus Schleimhautproben des Septums (n = 27) ermittelt wurden. Mit zunehmendem Alter nimmt die Anzahl teilender Basalzellen tendenziell ab (*Adaptiert von Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022); erstellt mit biorender.com.*)

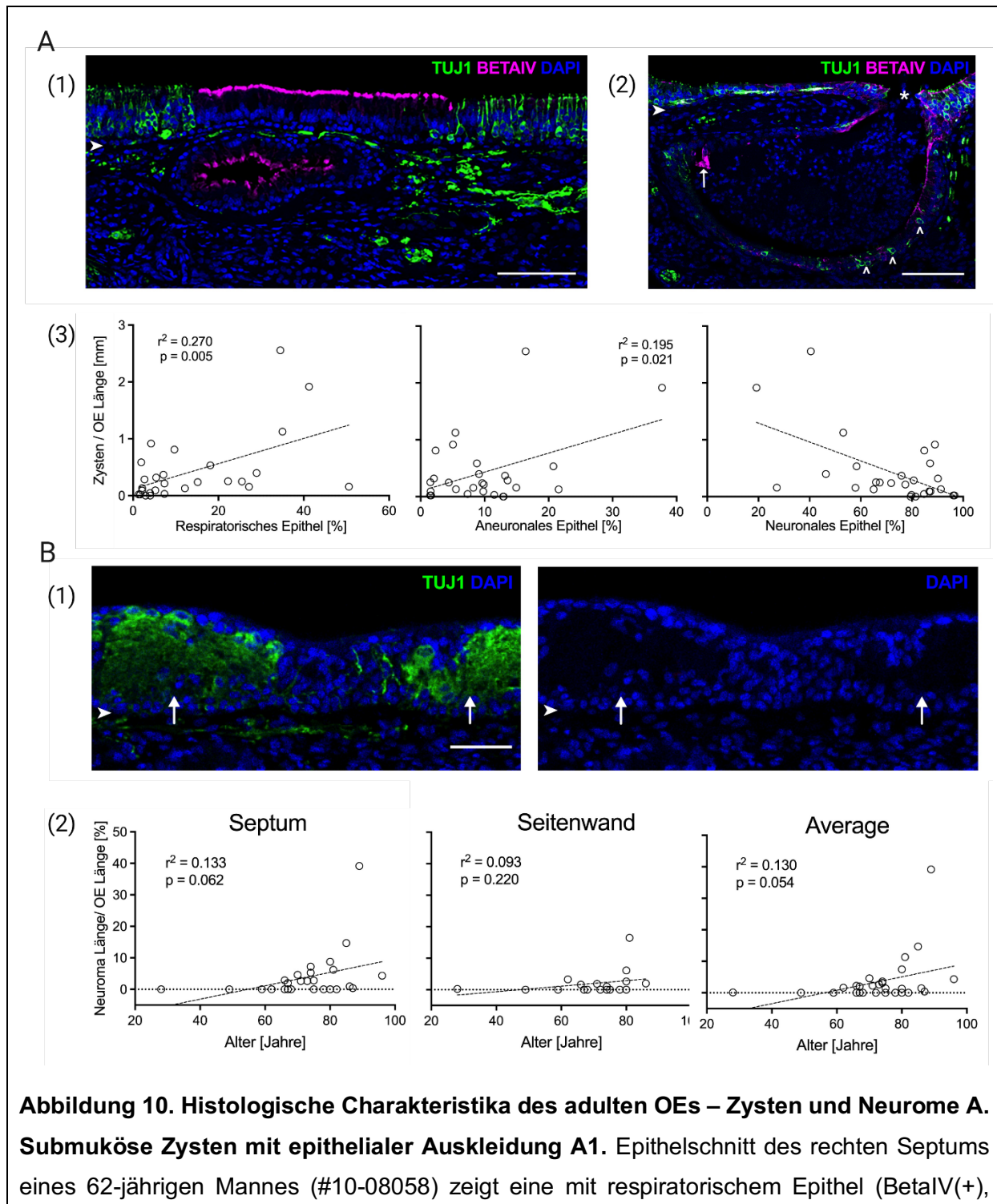
3.1.4.4 Submukosale Zysten mit epithelialer Auskleidung

Als eine Besonderheit des erwachsenen OEs identifizierte ich das Vorkommen submuköser Zysten. Einige dieser Zysten zeigten kein spezifisches Färbemuster und waren am ehesten vergrößerte Lumina der in der Lamina propria liegenden Bowman-Drüsen. Andere waren jedoch von verschiedenen spezifischen Epitheltypen ausgekleidet und exklusiv in adultem Gewebe zu finden. Diese traten in unterschiedlichen Größen und Formen auf und schienen gelegentlich das über ihnen liegende Epithel zu durchbrechen (**Abbildung 10A**). In vielen Fällen war das olfaktorische Epithel oberhalb dieser Zysten mit epithelialer Auskleidung dünner und das neurogene Epithel von aneuralen oder respiratorischen Metaplasien ersetzt. In Regionen, in denen sich die Zysten mit epithelialer Auskleidung in das über ihnen liegende Epithel öffneten, schienen sie kontinuierlich mit dem Epithel desselben Bereiches zu verschmelzen. Entsprechend ihres Färbemusters teilte ich die Zysten mit epithelialer Auskleidung in neuronale (Tuj1+), respiratorische (BetIV+) und gemischte Zysten (Tuj1+/BetIV+) ein (**Abbildung 10A**) und quantifizierte die Anzahl der einzelnen Zystentypen an Epithelstreifen der Septumschleimhaut von 27 Autopsiespendern:innen. Obwohl Zysten mit epithelialer Auskleidung ein Alleinstellungsmerkmal des adulten OEs waren, ergab sich kein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich ihrer Anzahl und dem Alter oder Demenz. Darüber hinaus untersuchte ich, ob die Gesamtanzahl der Zysten mit epithelialer Auskleidung mit dem Ausmaß der metaplastischen Veränderung des OEs korreliert. In der linearen Regressionsanalyse ergab sich ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen der Gesamtanzahl submukosaler Zysten mit epithelialer Auskleidung und dem Anteil respiratorischer Metaplasie ($p = 0,005$, $r^2 = 0,27$) sowie neurogener Erschöpfung ($p=0,02$, $r^2=0,2$) am Gesamt-OE (**Abbildung 10B**). Eine Korrelation zwischen der Anzahl der neuronalen Zysten und der Ausdehnung des neuronalen Epithels bzw. der Anzahl respiratorischer Zysten und der Ausdehnung des metaplastischen respiratorischen Epithels ergab sich nicht.

3.1.4.5 Epitheliale Neurome

Als eine weitere charakteristische Eigenschaft des adulten OEs identifizierte ich das Auftreten von Neuomen. Diese waren charakterisiert durch ein dichtes Geflecht von Axonen unreifer olfaktorischer Rezeptorneurone (Tuj1(+), OMP(-)) und enthielten keine Zellkerne (DAPI (-)) (**Abbildung 10B**). Innerhalb der adulten Proben fiel eine hohe interindividuelle Varianz bezüglich der Größe der Neuome auf. In embryonalen Proben und adulten OEs die aus Autopsiespendern:innen mit einem Alter von 60 Jahren oder jünger stammten, fanden sich keine Neuome. Die Analyse des prozentualen Anteils von Neuomen durchsetztem Epithels am Gesamt OE als Funktion des Alters von Epithelstreifen des Septums ($n=27$) und der

Seitenwand (n=18) sowie der zusammengefassten Werte der Untergruppen Septum und Seitenwand (n=29) ergab keine statistisch signifikante Korrelation mit zunehmenden Alter. In Epithelstreifen des Septums identifizierte ich jedoch mit zunehmendem Alter eine numerische Zunahme von Neuromen durchsetztem Epithel ($p = 0,06$, $r^2 = 0,13$). Diese Tendenz wurde auch beobachtet, wenn die Werte von Schleimhautproben des Septums und der Seitenwand gemittelt wurden ($p = 0,05$, $r^2 = 0,13$) (**Abbildung 10B**). Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil Neuromen-haltigen OEs und Demenz ergab sich nicht.



magenta) ausgekleidete, submuköse Zyste. Das darüberliegende Epithel ist ebenfalls respiratorisch und wird von neuronalem Epithel (Tuj1(+), **grün**) flankiert. **Maßstab = 100µm.**

A2. Epithelschnitt des linken Septums eines 87-jährigen Mannes (#08-06004) zeigt eine gemischte Zyste mit Tuj1(+) olfaktorischen Rezeptorneuronen (**grün, offene Pfeilspitzen**) und einem kleinen Bereich mit Beta-IV(+) respiratorischen Epithel (**magenta, Pfeil**). Das darüberliegende Epithel ist im Vergleich zum übrigen Epithel stark ausgedünnt und enthält kaum olfaktorische Rezeptorneurone. Die Zyste scheint sich in das über ihr liegende Epithel zu öffnen (*). Maßstab = 100µm. **A3.** Die Anzahl der submuköser mit epithelialer Auskleidung korreliert direkt mit dem Anteil respiratorischer Metaplasie sowie aneuralen Epithel am Gesamt-OE. Umgekehrt ist ein höherer Anteil neurogenen Epithels mit einer geringeren Anzahl submuköser Zysten mit epithelialer Auskleidung assoziiert. **B. Neurome**

B1. Epithelschnitt des rechten Septums eines 81-jährigen Mannes (#11-09008) zeigt Tuj1(+) Axone olfaktorischer Rezeptorneurone (**grün**), die Neurome formen. Der von den Neuomen eingenommene Bereich ist azellulär (Zellkernfärbung (**DAPI, blau**) fehlt). **Maßstab = 100 µm.**

B2. Abgebildet ist der Anteil von Neuomen-durchsetztem OE am Gesamt-OE als Funktion des Alters, berechnet für Epithelstreifen aus Schleimhautblättern des Septums und der Seitenwand sowie dem Durchschnitt aus Werten des Septums und der Seitenwand. Mit zunehmendem Alter zeigt sich ein starker Trend zur Zunahme von Neuronen-durchsetztem OE. Pfeilspitzen in A1, A2 und B1 zeigen die Basallamina an (*Adaptiert von Fitzek et al. (Fitzek et al., 2022); erstellt mit biorender.com*).

3.2 Der Bulbus olfactorius

3.2.1 OB-Dimension in Abhängigkeit von Alter und Demenz

Die durchschnittliche Bulbuslänge (n= 39) betrug 10,85 mm ± 0,32 mm und reichte von minimal 6,59 mm bis maximal 15,54 mm. Das Bulbusvolumen lag im Durchschnitt bei 51,24 mm³ ± 2,04 mm³, reichte von 25,68 mm³ bis zu 94,89 mm³ und nahm mit zunehmendem Alter signifikant ab (p = 0,02, r² = 0,25). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem OB-Volumen und Demenz ergab sich nicht.

3.2.2 Qualitative Analyse des menschlichen olfaktorischen Bulbus

Analog zum Vorgehen beim OE ging der quantitativen Analyse ausgewählter Parameter des OBs eine detaillierte qualitative Analyse voraus, bei der anatomische Strukturen unterschiedlicher OB-Schichten mithilfe verschiedener Marker und Transkriptionsfaktoren visualisiert wurden (**Abbildung 11A**). Im Fokus meiner Untersuchung standen erstens die OMP(+)-Schicht der afferenten marklosen Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone (ONL),

zweitens die glomeruläre Schicht (GL) inklusiver der VGlut2(+)-Synapsen zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen und sekundären Projektionsneuronen als Korrelat der Glomeruli (Maresh et al., 2008) sowie die umliegenden TH(+) periglomerulären Zellen und drittens die Tbx21(+)-Mitralzellschicht (MCL). Im Vergleich zu Nagetieren und anderen Nichtprimaten sowie zwischen adulten und embryonalen Proben ergaben sich dabei deutliche Unterschiede hinsichtlich der laminaren Mikrostruktur: Die äußerste Schicht des menschlichen OBs stellte wie in Nagetieren die ONL mit den aus dem OE eintreffenden afferenten, marklosen Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone dar (**Abbildung 11Aa**). Die ONL der adulten Bulbi fiel dabei im Vergleich zu embryonalen Proben deutlich dünner aus. Angrenzend an die ONL identifizierte ich durch Ko-Lokalisierung von OMP und VGlut2, wie in Nagetieren und anderen menschlichen Autopsiestudien (Maresh et al., 2008; Zapiec et al., 2017), die Glomeruli mit ihren Synapsen zwischen Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone und sekundären Projektionsneurone (Mitral- und Büschelzellen). Im Gegensatz zu den kugelförmigen Glomeruli der Nagetiere, welche klassischerweise in einer Schicht angeordnet sind (siehe Einleitung 1.3.2), waren die Glomeruli im adulten Bulbus des Menschen weniger geordnet, oft in mehreren Schichten aufgereiht und reichten tendenziell tiefer in den Bulbus hinein (**Abbildung 11Aa**). Darüber hinaus fiel eine ungleichmäßige Verteilung der Glomeruli innerhalb des OBs (ventral>dorsal) auf. Die Glomeruli des embryonalen OBs erschienen deutlich kleiner, vergleichbar mit kleinen Knospen und waren ähnlich, wie bei Nagetieren, nur in einer Schicht angeordnet (**Abbildung 11Aa**). Dopaminerge periglomeruläre Zellen wurden mithilfe von Antikörpern gegen Trypsin-Hydroxylase (TH) visualisiert und umgaben sowohl in adulten als auch embryonalen Proben die Glomeruli. In embryonalen Bulbus waren die periglomerulären Zellen eng an die Glomeruli angelagert, sammelten sich jedoch vornehmlich in Bereich mit weniger glomerulären Knospen. Im Gegensatz dazu waren die periglomerulären Zellen des erwachsenen OBs räumlich deutlich von den Glomeruli getrennt (**Abbildung 11Ab**). Mitralzellen des OBs wurden mit Antikörpern gegen den T-Box-Transkriptionsfaktor Tbx21 sichtbar gemacht (Faedo et al., 2002). In unseren Proben fanden sich die Mitralzellen in adulten OBs einzeln innerhalb der äußeren plexiformen Schicht verteilt. Im Gegensatz dazu bildeten die Mitralzellen in fetalen Bulbi, wie aus OBs der Nagetiere bekannt, eine zusammenhängende einheitliche Mitralzellschicht (**Abbildung 11Ac**).

3.2.3 Quantifizierung der Glomeruli

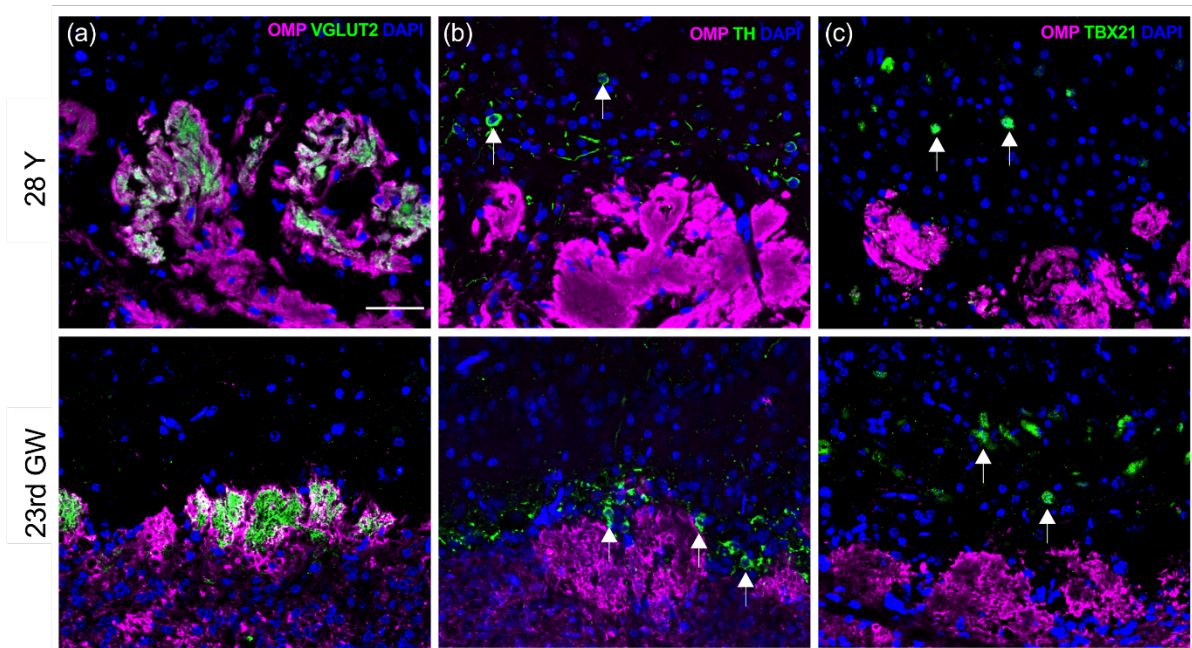
Angesichts der Schwierigkeit, einzelne Glomeruli voneinander zu differenzieren, bestimmte ich zur Quantifizierung der Glomeruli bei 35 OBs von 23 Autopsiespendern:innen den Anteil der kumulativen Fläche glomerulärer VGlut2(+)-Färbung an der Gesamtoberfläche des OBs. Die auf diese Weise berechnete relative Fläche des glomerulären Nervengeflechts betrug $1,65 \pm 0,17$ %, reichte von minimal 0,6 % bis maximal 3,49 % und korrelierte direkt mit dem

Bulbusvolumen ($p = 0,05$, $r^2 = 0,11$; LR, $n = 23$). Wie bereits in der qualitativen Analyse angedeutet, enthielt die ventrale Hälfte des OBs, die an die Siebbeinplatte grenzt, im Durchschnitt eine signifikant größere glomeruläre Fläche, als die dorsale Hälfte ($1,04 \pm 0,1$ % gegenüber $0,47 \pm 0,08$ % (SEM); $t = 3,95$, $p = 0,0003$, ungepaarter t-Test, $n = 23$) (**Abbildung 11B1**). Mit zunehmendem Alter identifizierte ich einen Verlust an VGluT2(+)-glomerulärer Fläche ($p = 0,002$, $r^2 = 0,38$; LR, $n = 23$) (Abbildung 10C). Untersuchte man die glomeruläre Innervation als Funktion des Alters getrennt für den ventralen und dorsalen Bulbus, so fand ich eine signifikante Abnahme der glomerulären Innervation mit dem Alter lediglich für die ventrale Hälfte ($p = 0,006$, $r^2 = 0,31$; LR, $n = 23$), nicht aber den Anteil der glomerulären Fläche der dorsalen Hälfte ($p = 0,44$, $r^2 = 0,03$; LR, $n = 23$) (**Abbildung 11B2**). Ein Zusammenhang zwischen der glomerulären Fläche und der Diagnose einer Demenz ergab sich nicht.

3.3. Intraindividuelle Korrelationen zwischen OE und OB

In getrennten Analysen fand ich sowohl im OE als auch im OB einen Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone im Alter. Da uns Gewebeproben des OEs und OBs von ein und denselben Individuen vorlagen, untersuchte ich abschließend, ob diese beiden Parameter sich intraindividuell bedingen. In der linearen Regressionsanalyse ergab sich weder für den Anteil reifer olfaktorischer Rezeptorneurone noch für den Anteil der Gesamt-neuronalen Population, den Reifegradindex oder für die Parameter, die in der Analyse gesamter Schleimhautblätter erhoben wurden (OE-Fläche, verbleibendes OE), ein signifikanter Zusammenhang mit der glomerulären Fläche der dazugehörigen Bulbi. Da in der vorherigen Analyse nur die glomeruläre Fläche des ventralen Bulbus signifikante Veränderungen im Alter ergeben hatte, untersuchte ich gesondert den Zusammenhang zwischen dem neuronalen Status des OEs und der glomerulären Fläche des ventralen Bulbus. Dabei stellte ich eine positive intraindividuelle Korrelation zwischen dem Anteil der ventralen glomerulären Fläche und dem Anteil reifer olfaktorischer Rezeptorneurone am Gesamt-OE fest ($p = 0,02$, $r^2 = 0,24$, $n = 21$; LR).

A



B

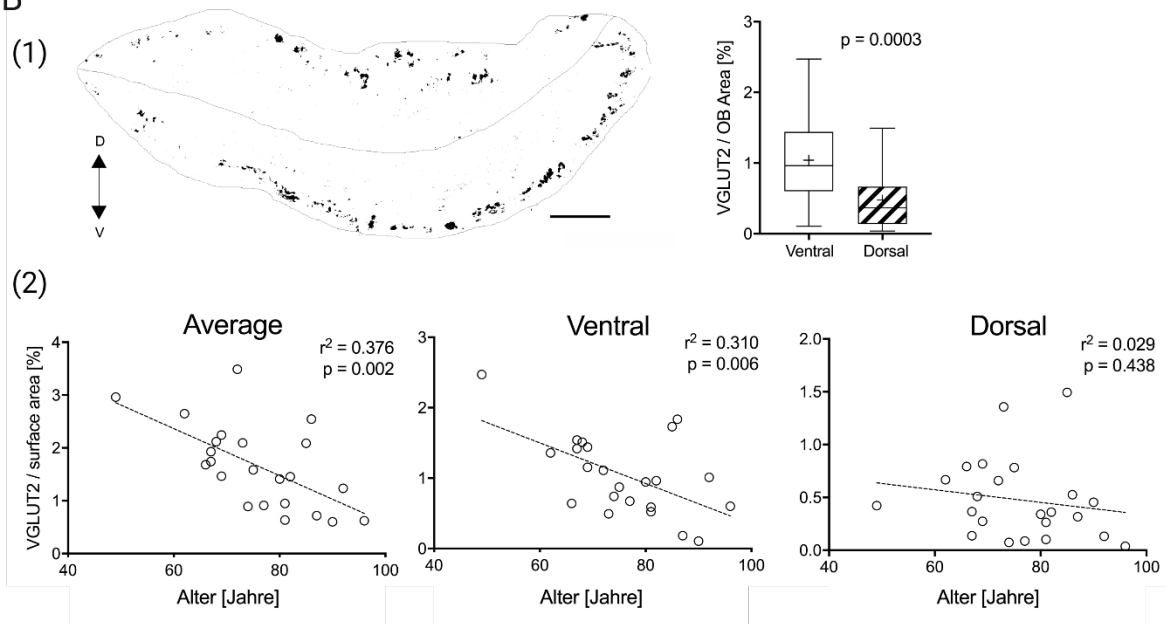


Abbildung 11. Histologische Analyse des OBs und seinen Veränderungen im Alter an Epithelschnitten. A. Vergleich von koronaren Schnitten durch den OB eines gesunden 28-jährigen Mannes (**oben**, #12-080313) und eines männlichen Embryos aus der 23. Schwangerschaftswoche (**unten**, #6167). (a) Die periphere Schicht der eintretenden, afferenten Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone (**magenta**) ist mit Antikörpern gegen OMP visualisiert. Die terminalen Synapsen innerhalb der Glomeruli zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen und Projektionsneuronen zweiter Ordnung (**grün**) wurden mit Antikörpern gegen VGlut2 markiert. Während embryonale Glomeruli als kleine Knospen erscheinen, sind adulte Glomeruli größer, schwieriger als einzelne Einheiten zu differenzieren und erstrecken

sich oft in tiefere Regionen (siehe B1 für eine geringere Vergrößerung). **(b)** Periglomeruläre Zellen (**durch Pfeile markiert**), die mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase (**TH, grün**) markiert wurden, zeigen eine vergleichbare Position um einzelne Glomeruli sowohl im adulten als auch im fetalen Gewebe. Im embryonalen Gewebe erscheinen sie jedoch näher an den Glomeruli. **(c)** Mitralzellen (**durch Pfeile markiert**) sind mit Antikörpern gegen TBX21 (**grün**) visualisiert. Während die Mitralzellen im Embryo eine einheitliche, die ganze Zirkumferenz umgebende Schicht bilden, die tief unterhalb der glomerulären Schicht liegt und vergleichbar mit der aus Nagetieren ist, erscheinen die Mitralzellen im adulten OB zahlenmäßig stark reduziert und eher sporadisch. **Maßstab = 50 µm.** **B1.** Schematische Darstellung eines Mosaikbildes eines Epithelschnitts des Bulbus eines 75-jährigen Mannes (#07-08032, linker Bulbus), der mit VGlut2 (**schwarz**) gefärbt wurde, um Glomeruli zu identifizieren. Eine Linie in der Mitte unterteilt den Bulbus in eine dorsale (**D**) und eine ventrale (**V**) Hälfte (**Maßstab = 0,5 mm**). Die durchschnittliche prozentuale Fläche der positiven VGlut2-Färbung in der ventralen und dorsalen Hälfte der OBs wurde über alle Exemplare (n = 23) verglichen. In der ventralen Hälfte des OBs ergab sich ein signifikant höher Anteil glomerulärer Färbung als in der dorsalen Hälfte. **B2.** Abgebildet ist der Anteil glomerulärer Färbung innerhalb des OBs im Verhältnis zum Alter. Der Anteil der glomerulären Färbung pro Bulbus nimmt mit zunehmendem Alter ab, jedoch nur in der ventralen Hälfte (*Adaptiert von Fitzek et al.*(Fitzek et al., 2022); *erstellt mit biorender.com*).

3 Diskussion und Ausblick

In der vorgestellten Studie führte ich mittels Autopsiepräparaten von insgesamt 36 Spendern:innen, eine eingehende qualitative sowie quantitative immunhistochemische Analyse des menschlichen OEs, des OBs sowie der Projektion aus dem OE in den OB durch.

Bei der Beurteilung histomorphologischer Veränderungen des menschlichen Geruchssystems, die auf der Analyse einzelner Gewebeschnitte beruhen, gilt es im Allgemeinen zu berücksichtigen, dass diese auf einen kleinen Bereich des Riechepithels bzw. Riechkolbens beschränkt sind und angesichts der hohen Variabilität insbesondere innerhalb des OEs gegebenenfalls nicht die Gesamtheit des olfaktorischen Systems widerspiegeln. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen und einen möglichst ganzheitlichen Einblick in den histologischen Aufbau des OEs zu erhalten, untersuchten wir in einem ersten Schritt vollständige Riechepithelblätter. Dies erlaubte eine umfassende histopathologische Beurteilung der olfaktorischen Peripherie, welche anschließend mikroskopisch an einzelnen Epithelschnitten detailliert ausgearbeitet wurde.

Um darüber hinaus sicherzustellen, dass auch bei der Analyse einzelner Gewebeschnitte eine umfassende Darstellung des Riechepithels und des Bulbus gewährleistet war, wurden die gewählten Präparate des OEs und des OB vor der Analyse in separate Abschnitte unterteilt und anschließend ein repräsentativer Ausschnitt eines jeden Abschnitts untersucht. Darüber hinaus wurden neben adultem Gewebe embryonale Proben untersucht und als Referenz für ein intaktes Geruchssystem genutzt.

Die vorgestellten Daten bieten neben einer detaillierten Beschreibung des allgemeinen histologischen Aufbaus des menschlichen Geruchssystems seltene Einblicke in die axonale Projektion aus dem OE in den OB. Außerdem liefern sie dank der Identifikation histopathologischer Veränderungen im Alter potenzielle Korrelate altersbedingten Geruchsverlusts.

3.1 Das olfaktorische Epithel des Menschen

3.1.1 Der makroskopische Aufbau des olfaktorischen Epithels und seine Veränderungen im Laufe des Lebens

Das OE des erwachsenen Menschen ist in der oberen Nasenmuschel und der angrenzenden Septumschleimhaut lokalisiert (Naessen, 1970; Holbrook et al., 2011; T. D. Smith & Bhatnagar, 2019). In unserer Analyse adulter Proben spiegelte die Lage des septalen OEs im

Wesentlichen die Grenzen des lateralen OEs wider und die Lokalisation des OEs entsprach im Allgemeinen den Ergebnissen aus vorangegangenen Studien (T. D. Smith & Bhatnagar, 2019; Omura et al., 2022). Im Gegensatz zu früheren Biopsiestudien (Féron et al., 1998; Nibu et al., 1999; Leopold et al., 2000) konnte ich in keinem der Präparate olfaktorische Rezeptorneurone am vorderen Rand der mittleren Nasenmuschel nachweisen. Allerdings sind Unterschiede in Bezug auf die Innervation der mittleren Nasenmuscheln bekannt (T. D. Smith & Bhatnagar, 2019). Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der Innervation könnte die Verdrängung des Riechepithels durch respiratorische Metaplasie sein, wie sie häufig in adultem Gewebe zu beobachten ist (Leopold et al., 2000).

Der Geruchssinn des Menschen entwickelt sich als erster spezifischer Sinn und ermöglicht bereits im Mutterleib ab der 28.-30. Schwangerschaftswoche die Differenzierung von Geruchsmolekülen, welche über das Fruchtwasser transportiert werden (Sarnat & Flores-Sarnat, 2019). Passend hierzu ähnelte die Lokalisation des OEs in embryonalen Proben in Bezug zu den anatomischen Strukturen der Nasenhöhle bereits im Wesentlichen der Lokalisation der Erwachsenen nur in kleinerem Maßstab.

Trotz der Fähigkeit des olfaktorischen Systems zur lebenslangen Regeneration (Schwob, 2002; Brann et al., 2015; Durante et al., 2020), ist eine Verschlechterung der Geruchsfunktion mit zunehmendem Alter weitreichend bekannt (Hüttenbrink et al., 2013; Tzeng et al., 2021) und zugrunde liegende strukturelle Veränderungen des OEs und OBs anzunehmen. Tierstudien zeigen, dass altersbedingte Veränderungen im OE überwiegend im Bereich des anterodorsalen Septums und den gegenüberliegenden Epithelien der Nasenmuscheln auftreten, während das posteriore Epithel im Alter gut erhalten bleibt (Loo et al., 1996). Mit zunehmendem Alter identifizierte ich neben einer allgemeinen Reduktion des prozentualen Anteils neuronenhaltigen und damit olfaktorischen Epithels, passend hierzu einen Trend zur Verschiebung des Mittelpunkts des OEs nach dorsal und superior. Dies lässt einen vorrangigen Verlust der ventral gelegenen olfaktorischen Rezeptorneurone im Alter vermuten. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Zahl der reifen olfaktorischen Rezeptorneurone und ihr Differenzierungsgrad unabhängig vom Alter physiologisch entlang der dorso-ventralen Achse des OEs mit Entfernung von der Siebbeinplatte abnimmt (Omura et al., 2022). Dieses Gefälle scheint sich im Alter durch den angedeuteten vorrangigen Verlust ventraler olfaktorischer Rezeptorneurone weiter zu verstärken. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die exponierte Position des ventral und anterior gelegenen Riechepithels sein. Dieses ist dem Luftstrom besser zugänglich und entsprechend exponierter gegenüber pathogenen Einflüssen wie Toxinen oder Virusinfektionen, welche das OE schädigen, verschiedene Formen des Zelltods auslösen (Douek et al., 1975) und damit nachweislich zu klinischen Riechstörungen beitragen können (Ajmani et al., 2016; Hummel et al., 2017).

3.1.2 Der mikroskopische Aufbau des olfaktorischen Epithels und seine Veränderungen über die Lebensspanne

Zum tiefergreifenden Verständnis der Struktur und Zusammensetzung einzelner Zelltypen im OE und deren Veränderung im Alter erfolgte eine detaillierte qualitative sowie quantitative mikroskopisch-histologische Analyse von 10-12µm dicken Epithelschnitten. Die Ergebnisse meiner Analysen zur allgemeinen Morphologie und strukturellen Organisation des menschlichen Riechepithels stimmen überwiegend mit Erkenntnissen aus vorangegangenen Autopsiestudien überein (Naessen, 1971; Nakashima et al., 1984; Holbrook et al., 2011). Das menschliche OE, das durch sein charakteristisches pseudostratifiziertes, säulenförmiges neuronales Epithel gekennzeichnet war, zeigte eine laminare Organisation und setzte sich im Wesentlichen aus den drei Zelltypen der olfaktorischen Rezeptorneurone, den Stützzellen und den basalen Vorläuferzellen zusammen.

Die beschriebene morphologische Grundordnung zeigte sich sowohl in adulten als auch fetalen Proben und deckt sich mit früheren Autopsiestudien, in denen die charakteristische Gliederung des OEs in laminare Schichten bereits ab einem Alter von 14 Wochen beschrieben ist (Kimura et al., 2009; Sarnat & Flores-Sarnat, 2019).

Dennoch imponierten im embryonalen OE markante Unterschiede im Vergleich zum adulten OE insbesondere in Bezug auf die Epitheldicke und die Strenge der laminaren Organisation. So war die neuroepitheliale Schicht des Embryos breiter als die breiteste Stelle des adulten Gewebes. Ähnlich wie bei Mäusen (Rosli et al., 1999), waren die reifen olfaktorischen Rezeptorneurone der Feten in der mittleren Schicht des OEs näher an der apikalen Oberfläche lokalisiert. Im OE von Erwachsenen hingegen war die Position der reifen olfaktorischen Rezeptorneurone weniger auf die apikalen Regionen der neuronalen Schicht beschränkt, was zu einer Auflösung der im Feten sehr strikten räumlichen Trennung von reifen und unreifen olfaktorischen Rezeptorneuronen führte.

Neben den beschriebenen Veränderungen der histologischen Grundordnung zeigten sich mit zunehmendem Alter in der quantitativen Analyse adulter Epithelien unterschiedlichen Alters weiterhin spezifische histopathologische Veränderungen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

3.1.2.1 Der Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone und Ersatz mit respiratorischer Metaplasie

Während das OE der embryonalen Autopsiepräparate eine kontinuierliche, ununterbrochene Schicht an olfaktorischen Rezeptorneuronen aufwies und sich klar vom angrenzenden respiratorischen Epithel differenzieren ließ, zeigte sich das adulte neuronale Gewebe mit

zunehmenden Alter lückenhaft und ging teilweise nahezu fließend in das respiratorische Epithel über. Einerseits fanden sich vermehrt Bereiche von Epithelien, die weder olfaktorische Rezeptorneurone noch anderweitige Zelltypen enthielten (aneurales Epithel), andererseits Abschnitte, die durch Zilien-tragende, respiratorische Zellen (Respiratorische Metaplasie) ersetzt waren. Zudem konnten Epithelien identifiziert werden, die sich sowohl aus respiratorischen Zellen als auch Nervenzellen zusammensetzen (Gemischtes Epithel).

Die quantitative Analyse einzelner Epithelschnitte ergab einen inversen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Anzahl reifer olfaktorischer Rezeptorneurone innerhalb des OEs. Dies deckt sich mit der Beobachtung aus der makroskopischen Analyse gesamter Schleimhautblätter, in welcher sich eine Abnahme der Gesamtfläche des OEs im Alter zeigte und ist konsistent mit früheren Autopsiestudien (Naessen, 1971; Paik et al., 1992; Loo et al., 1996; Rosli et al., 1999; Mobley et al., 2014; Doty & Kamath, 2014; Attems et al., 2015). Da die Wahrnehmung von Gerüchen mit der Bindung einzelner Geruchsstoffe an die olfaktorischen Rezeptoren der Dendriten reifer olfaktorischer Rezeptorneurone beginnt (Durante et al., 2020; Patel et al., 2022), steht die Anzahl reifer olfaktorischer Rezeptorneurone in direktem Zusammenhang mit der Geruchsfunktion (Mori & Sakano, 2011). Ein Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone mit zunehmendem Alter stellt daher ein mögliches Korrelat altersbedingten Geruchsverlusts dar. Trotz der bekannten und gut untersuchten Assoziation von Geruchsstörungen im Alter (Doty et al., 1984; Hummel et al., 2007; Lu et al., 2021; Patel et al., 2022), identifizierten wir jedoch selbst im höchsten Alter stets eine gewisse Menge an olfaktorischen Rezeptorneuronen. Es ist daher anzunehmen, dass zur effektiven Geruchswahrnehmung eine kritische Masse innervierender olfaktorischer Rezeptorneurone notwendig ist, welche mit zunehmendem Alter unterschritten wird.

Neben der neuronalen Verarmung des OEs wurde das Vorkommen respiratorischer Metaplasie quantifiziert. Respiratorische Metaplasie ist eine häufige Beobachtung in Autopsie- und Biopsiestudien des menschlichen OEs (Nakashima et al., 1984, 1991; Morrison & Costanzo, 1992; Holbrook et al., 2005, 2011). Sie ist sowohl im Tiermodell für olfaktorische Alterung (Child et al., 2018) als auch nach schweren direkten Epithelschäden beschrieben (Xie et al., 2013) und kann als eine Art Standard-Schutzepithel nach neurogener Erschöpfung entstehen (Håglin et al., 2020). Entgegen unserer Hypothese konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil des respiratorischen Epithels an der Gesamtlänge des OEs und dem Alter feststellen. Möglicherweise ist die Ursache dieser Beobachtung in der Art der Datenerhebung begründet: Um die Länge des OEs zu bestimmen, definierten wir zunächst feste Start- und Endpunkte. Dorsal wurden die Siebbeinplatte und ventral der Beginn eines kontinuierlichen respiratorischen Epithels als Grenzen festgelegt, und jegliches respiratorische Epithel innerhalb dieser Grenzen als respiratorische Metaplasie

gewertet. Wie bereits berichtet, beobachteten wir im Alter eine Verschiebung des Mittelpunkts des OEs nach dorsal und superior, was auf einen Verlust des ventralen Anteils des OEs hindeutete. Der ventrale Teil des OEs geht am äußersten Rand physiologisch in respiratorisches Epithel über. Der in der Analyse gesamter Schleimhautblätter beobachtete Trend zum Verlust von Teilen des ventralen OEs lässt nun vermuten, dass zum Zeitpunkt der Analyse ein nicht zu vernachlässigender Teil des ventralen OEs bereits respiratorisch umgewandelt war (Nakashima et al., 1984; Paik et al., 1992; Féron et al., 1998). Demnach war es uns am ventralen Rand nicht möglich, zwischen neu gebildetem, metaplastischem respiratorischem Epithel und der ursprünglichen Grenze zum physiologischen respiratorischen Epithel zu unterscheiden. Dies könnte zu einer Unterschätzung der Gesamtmenge der respiratorischen Metaplasie geführt haben und das Fehlen einer signifikanten Zunahme mit zunehmendem Alter begründen.

Als indirekte Bestätigung für diese Hypothese fanden wir eine altersabhängige Zunahme an Epithel, das sich sowohl aus respiratorischen Zellen als auch olfaktorischen Rezeptorneuronen zusammensetzte (gemischtes Epithel). Gemischtes Epithel stellt möglicherweise eine Art Übergangsepithel im Rahmen der metaplastischen Degeneration dar, bevor das OE vollständig respiratorisch umgewandelt ist.

Alternativ zu der von uns gewählten Methodik hätte ebenso ein fester anatomischer Referenzpunkt anstelle einer im Alter variierenden Grenze als Start-/Endpunkt gewählt werden können. Allerdings hätte auch dies in Anbetracht der hohen interindividuellen Varianz in Bezug auf die Ausbreitung des olfaktorischen Epithels zu einer Unter- oder Überschätzung führen können.

3.1.2.2 Hypothesen zu zugrundeliegenden Ursachen der beobachteten Degeneration des olfaktorischen Epithels im Alter

Die zugrundeliegende Ursache für den beobachteten Verlust reifer olfaktorischer Rezeptorneurone im Alter und das Auftreten von metaplastischem respiratorischem Epithel ist bisher nicht bekannt. Grundsätzlich ist das olfaktorische Epithel dank basaler Vorläuferzellen wie den HBZ und GBZ, bis ins hohe Alter zur fortlaufenden Regeneration befähigt (Schwob, 2002; Brann et al., 2015; Durante et al., 2020). Wie in Tierversuchen mit direkten Epithelverletzungen und in einem Mausmodell der olfaktorischen Alterung gezeigt werden konnte, wird das OE nur in Bereichen wiederhergestellt, in denen multipotente GBZs erhalten sind, während Bereiche ohne GBZs mit metaplastischem, respiratorischem Epithel neu besiedelt werden (Jang et al., 2003; Child et al., 2018). Diese neuroregenerative Kapazität ist jedoch nicht unbegrenzt und nimmt bei Nagetieren mit zunehmendem Alter ab (Loo et al., 1996; Weiler & Farbman, 1997). So ergaben Untersuchungen in Nagetieren, dass Alter und

wiederholte Virusinfektionen zwar zunächst zur Aktivierung basaler Stammzellen führen, im Verlauf aber das Potenzial zur Bildung neuer olfaktorischer Rezeptorneurone erschöpfen (Håglin et al., 2020). Entsprechend fanden Studien in Nagetieren eine Verlangsamung der olfaktorischen neuronalen Regenerationsrate mit zunehmendem Alter und die kompensatorische Ausbildung respiratorischer Metaplasie (Suzukawa et al., 2011; Child et al., 2018). Eine mögliche Hypothese für einen altersabhängigen Verlust reifer olfaktorischer Rezeptorneurone und das Auftreten respiratorischer Metaplasie ist demnach das Versagen der kontinuierlichen Regeneration des OEs durch basale Vorläuferzellen. In Nagetieren kommt es im Alter zu einem Verlust proliferierender Basalzellen, welche zur Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase aktiviert werden, sowie solchen, die zur Regeneration nach Verletzungen des OEs herangezogen werden (Jia & Hegg, 2015; Ueha et al., 2018). Die quantitative Bestimmung menschlicher Basalzellen in unserer Studie ergab, dass die Population der proliferierenden GBZs mit zunehmendem Alter tendenziell abnimmt, ein signifikanter Zusammenhang fand sich jedoch nicht. Bei Versuchstieren enthalten Bereiche des aneuronalen und metaplastischen, respiratorischen Epithels ohne GBZs ruhende, nicht aktive horizontale Basalzellen (HBZ). Diese fanden wir in ähnlicher Weise in unseren Autopsiepräparaten, jedoch unabhängig von respiratorischer Metaplasie oder aneuronalen Veränderungen. HBZ, die auch als Reservestammzellpopulation bezeichnet werden, werden vorrangig bei schweren Verletzungen des Epithels, aber auch im Rahmen des normalen neuronalen Umsatzes zur Regeneration aller Zellpopulationen des Epithels herangezogen (Huard & Schwob, 1995; Leung et al., 2007; Iwai et al., 2008). Eine fehlende Aktivierung dieser Zellen in Bereichen mit und ohne metaplastische Umwandlung könnte auf eine fehlende Signalisierung der HBZ-Aktivierung und eine begrenzte Regenerationsfähigkeit während des natürlichen Alterungsprozesses hindeuten.

Zusätzlich zur zahlenmäßigen Reduktion proliferierender Basalzellen im Alter werden weitere zugrunde liegende Faktoren der Stammzellpopulation für den beobachteten Verlust neuronalen Epithels und Ersatz durch respiratorische Metaplasie diskutiert. Tierexperimentelle Studien suggerieren eine gestörte Funktionalität der verbleibenden Stammzellen mit zunehmendem Alter durch Veränderungen ihrer Transkription (Li et al., 2020) und eine aktuelle Studie an menschlichen Stammzellen des OEs ergab Hinweise für entzündliche Veränderungen der Stammzellpopulation als Funktion des Alters (Oliva et al., 2022). So weisen basale Stammzellen aus Epithelien altersbedingten Geruchsverlusts entzündlich bedingte molekulare Veränderungen auf, welche die Stammzellaktivität und entsprechend die epitheliale Homöostase behindern (Oliva et al., 2022). Außerdem scheint die normale neuronale Aktivität und die Erneuerung des Epithels durch basale Stammzellen anfällig für entzündliche Einflüsse zu sein, da die Stammzellen in Falle einer Entzündung funktionell von Regeneration zur Immunabwehr wechseln (Chen et al., 2019).

Zusammenfassend könnte also ein Zusammenspiel der altersbedingten Reduktion der basalen Stammzellen sowie eine Störung ihrer Transkription zur Beeinträchtigung der normalen epithelialen Homöostase im Alter führen und die beobachtete Degeneration des menschlichen olfaktorischen Epithels begründen.

3.1.2.3 Submuköse Zysten

Als weitere histopathologische Abweichung gealterten olfaktorischen Epithels beobachteten wir in adultem Gewebe das Vorkommen zystischer Strukturen in der Lamina propria. Einige dieser Zysten schienen vergrößerte Lumen der Bowman-Drüse zu sein. Daneben konnten jedoch weitere zystische Strukturen identifiziert werden, welche mit neuronenhaltigen, respiratorischen oder aneuralen Epithelien ausgekleidet waren. Derartige Strukturen waren vorrangig unter neuronal verarmten, ausgedünnten oder respiratorischen Epithelien lokalisiert wie zuvor in vereinzelt Publikationen beschrieben (Redman, 1974; Nakashima et al., 1991; Feng et al., 1997). Obwohl die genaue Funktion dieser Zysten bislang unbekannt ist, wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle in der Regeneration der menschlichen Riechschleimhaut spielen (Nakashima et al., 1991).

Die quantitative Analyse ergab einen signifikanten Zusammenhang der Gesamtzahl der Zysten und dem prozentualen Anteil aneuralen sowie respiratorischen Epithels, also den Bereichen, die bereits metaplastisch verändert waren. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zysten eine Rolle bei der Degeneration des über ihnen liegenden Oberflächenepithels spielen. Andersherum könnten die Zysten jedoch ebenso im Rahmen einer Reaktion auf die epitheliale Degeneration entstehen und einen alternativen Reparationsmechanismus der menschlichen Riechschleimhaut darstellen (Nakashima et al., 1991).

Interessanterweise wurde die Ko-Lokalisierung von Zysten und metaplastischem Epithel ebenfalls in einem Mausmodell der Alterung beobachtet (Kondo et al., 2009) und stellt möglicherweise eine altersspezifische Veränderung des OEs dar. Auch wenn wir in embryonalen OEs keine zystischen Strukturen identifizierten, ergab sich in unserer quantitativen Analyse kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der Anzahl zystischer Veränderungen, sodass submuköse Zysten im Menschen möglicherweise weniger einen altersspezifischen Prozess als vielmehr eine Reaktion auf Verletzungen des Epithels darstellen.

Ähnlich wie andere Autopsiestudien (Nakashima et al., 1991; Feng et al., 1997) beobachteten wir zudem, dass sich die zystischen Strukturen teilweise in das darüber liegende Epithel öffneten, als würden sie den darüber liegenden Teil ersetzen. Um sich dieser Beobachtung weiter zu nähern, wurden die zystischen Strukturen nach ihrem Färbemuster in

respiratorische, neuronale und gemischte Zysten klassifiziert und eine mögliche Assoziation zum darüber liegenden Epithel untersucht. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl neuronaler Zysten und dem prozentualen Anteil neuronalen Epithels oder zwischen der Anzahl respiratorischen Zysten und der Ausdehnung des metaplastischen respiratorischen Epithels fand sich jedoch nicht.

3.1.2.4 Neurome

Eine dritte morphologische Veränderung des erwachsenen menschlichen OEs und möglicherweise eine Reaktion des Epithels auf Verletzungen ist das Auftreten dystropher, olfaktorischer Neurome. Das Auftreten von Neuomen ist im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (Talamo et al., 1989; Trojanowski et al., 1991), Atemwegserkrankungen (z. B. Phantosmie) (Leopold et al., 2002) und posttraumatischer Anosmie (Jafek et al., 1989) beschrieben. Sie sind durch ein dichtes Geflecht dysfunktionaler Nervenfasern aus überwiegend unreifen Axonen charakterisiert, welche keine Zellkerne enthalten und keine synaptische Verbindung mit den Glomeruli der Bulbi ausbilden (Trojanowski et al., 1991; Holbrook et al., 2005, 2016), was auf eine fehlende Geruchsverarbeitung hindeutet.

In den uns vorliegenden Autopsiepräparaten beobachteten wir das Auftreten von Neuomen gehäuft in gealtertem OE, nicht aber in embryonalem Gewebe oder Proben von Patienten/innen im Alter von 60 Jahren oder jünger. Mit zunehmendem Alter häufen sich die gegen das OE oder den OB gerichteten Schädigungen durch Noxen und Viruserkrankungen sowie die Wahrscheinlichkeit, eine neurodegenerative Erkrankung zu erleiden und die neuronale Regenerationsfähigkeit nimmt ab (Suzukawa et al., 2011; DelGaudio & Panella, 2016; Child et al., 2018). Daher ist es nicht überraschend, dass in unserer Analyse Neurome in Abhängigkeit vom Alter tendenziell zunahmen und in embryonalem Gewebe nicht vorhanden waren. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der Länge OEs, welches mit Neuomen durchsetzt war, ließ sich in unserer Studie jedoch nicht nachweisen. Dies könnte in der Stichprobengröße und dem Alter der Probanden/innen begründet sein. Die untersuchten Epithelien waren möglicherweise bereits zu dysplastisch verändert und enthielten keine olfaktorischen Rezeptorneurone mehr, die Neuome hätten formen können. Die Analyse einer größeren Kohorte an jüngeren Probanden/innen hätte hier gegebenenfalls belastbarere Daten erbracht.

3.2 Der olfaktorische Bulbus des Menschen und die Projektion aus der olfaktorischen Peripherie in den olfaktorischen Bulbus

3.2.1 Der makro- und mikroskopischen Aufbau des olfaktorischen Bulbus und seine Veränderungen im Laufe des Lebens

Zur Wahrnehmung eines Geruchsstoffs wird nach initialer Aktivierung der olfaktorischen Rezeptorneurone das Geruchssignal zur anschließenden zerebralen Geruchsverarbeitung zu kortikalen Hirnstrukturen weitergeleitet (Mori et al., 1999; Hirata et al., 2019; Imamura et al., 2020). Hierbei spielt der OB als erste Schaltstelle zwischen dem peripheren und zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle (Mori et al., 1999). Das Volumen des OBs korreliert unabhängig vom Geschlecht, nasaler Kongestion und Nikotinkonsum mit der Geruchsfunktion (Buschhüter et al., 2008; Hummel et al., 2015; Lu et al., 2021). Übereinstimmend mit vorangegangenen MRT-Studien (Buschhüter et al., 2008; Çullu et al., 2020) beobachteten wir mit zunehmendem Alter eine signifikante Abnahme des Bulbusvolumens und damit ein mögliches Korrelat altersbedingten Geruchsverlusts.

Analog zur Analyse des menschlichen OEs, untersuchten wir den OB zusätzlich mikroskopisch sowohl qualitativ als auch quantitativ. Im Vergleich zu Nagetieren und anderen Nicht-Primaten wies die Mikrostruktur des humanen OBs deutliche Unterschiede auf. Im Allgemeinen spiegelten die Verteilung, Größe und Form der Glomeruli des erwachsenen OBs das unstrukturierte Erscheinungsbild und die Variabilität wider, die typischerweise im OB von Nagetieren während der Genesung nach Verletzungen zu beobachten sind, insbesondere bei der Reinnervation nach langjähriger, jedoch teilweise reversibler Denervierung (Cummings et al., 2000; Holbrook et al., 2014; Child et al., 2018). Mitralzellen traten im adulten OB nur sporadisch und intermittierend in der äußeren plexiformen Schicht auf und bildeten keine einheitliche Mitralzellschicht, wie man sie aus den OB der Maus kennt (Imamura et al., 2020).

Neben Unterschieden zu Nagetieren wurden Veränderungen der Zusammensetzung und des Aufbaus des OBs in Abhängigkeit vom zunehmenden Alter identifiziert, welche im Folgenden im Detail diskutiert werden sollen.

3.2.1.1 Qualitative Veränderungen der Glomerulären- und Mitralzellschicht im Alter – ektopes Glomeruli

Die Übertragung von Geruchssignalen aus der Peripherie in das ZNS erfolgt, wie zuvor beschrieben, im Spezifischen in den Glomeruli der glomerulären Schicht des OBs (Kauer & Cinelli, 1993; Mori et al., 1999). Dort bilden die olfaktorischen Rezeptorneurone Synapsen mit sekundären Sinneszellen wie den Mitralzellen und Büschelzellen aus (Buck & Axel, 1991;

Shepherd & Shepherd, 2004), welche das Geruchssignal anschließend überwiegend in Strukturen außerhalb des Bulbus, allen voran den olfaktorischen Kortex projizieren (Shepherd & Shepherd, 2004). Die Identifizierung der Glomeruli erfolgte in unserer Studie, wie auch in anderen Studien zuvor (Maresh et al., 2008), durch die Ko-Lokalisation von anti-OMP-Färbung, welche reife olfaktorische Rezeptorneurone markiert und anti-VGluT2-Färbung. VGluT2 ist der vesikuläre Glutamatttransporter 2, der selektiv in den Axonendigungen olfaktorischer Rezeptorneurone exprimiert wird (Gabellec et al., 2007). Dieser Transporter ist ein Marker für synaptische Verbindungen zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen und sekundären Sinneszellen innerhalb des OBs. Nachdem die Darstellung menschlicher Glomeruli mittels VGluT2-Färbung anhand einer entsprechenden Übereinstimmung mit dem OMP-Färbemuster bestätigt und etabliert wurde, erfolgten die weiteren Analysen der Glomeruli ausschließlich mittels VGluT2.

In den von uns analysierten Gewebeproben zeigten sich in der glomerulären Schicht des OB deutliche Unterschiede zwischen Feten und Erwachsenen. Die fetalen Glomeruli bildeten, wie aus dem Mausmodell bekannt, eine dicke, durchgehende Schicht, ohne, dass einzelne Glomeruli eindeutig voneinander abgrenzbar waren. Die glomeruläre Schicht des erwachsenen OB hingegen erschien desorganisiert, wie bereits in früheren histologischen Charakterisierungen des adulten OBs beschrieben (Maresh et al., 2008; Zapiec et al., 2017). Im Detail dehnten sich die Glomeruli des adulten OB in tiefere Regionen aus und waren häufiger in mehreren Schichten lokalisiert.

Interessanterweise wurde das Auftreten ähnlicher ektopter Glomeruli nach partieller Bulbektomie beschrieben (Hoogland et al., 2003). Als Ursache der beobachteten ektopten Glomeruli werden Axonen olfaktorischer Rezeptorneuronen diskutiert, denen es nicht gelungen ist, eine synaptische Verbindung mit Dendriten sekundärer Sinneszellen auszubilden, um einen klassischen Glomerulus zu formen (Hoogland et al., 2003). Entsprechend könnte die von uns beobachtete Zunahme ektopter Glomeruli im Alter in der qualitativen Analyse durch eine Abnahme der präzisen Projektion und Integration von olfaktorischen Rezeptorneuronen nach Schädigung oder Verletzung in das komplexe, bereits existierende synaptische Netzwerk der Glomeruli des Bulbus erklärt werden.

Alternativ könnte das Auftreten ektopter Glomeruli jedoch ebenso in dem im Alter zunehmenden Verlust von Mitralzellen, einem der wichtigsten synaptischen Partner der olfaktorischen Rezeptorneurone innerhalb der Glomeruli, begründet liegen. Olfaktorische Rezeptorneurone besitzen grundsätzlich die Fähigkeit, in verschiedene Teile des zentralen Nervensystems, wie beispielsweise das Vorderhirn zu projizieren, wenn ihr natürliches Ziel, wie unter anderem die Mitralzellen fehlt (P. P. C. Graziadei & Samanen, 1980). Es wird angenommen, dass die Mitralzellen neben der Weiterleitung des Geruchssignals in kortikale

Strukturen eine Art chemische und physikalische Barriere bilden (Treloar et al., 2002), welche verhindert, dass olfaktorische Rezeptorneurone in tiefere Regionen des Bulbus eindringen. Tatsächlich imponierten die Mitralzellen in unserer qualitativen Analyse des adulten OBs in Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Bhatnagar et al., 1987; Meisami et al., 1998; Smith et al., 1991), zahlenmäßig stark reduziert und waren diffus über die äußere plexiforme Schicht verstreut, anstatt eine klar definierte Mitralzellschicht zu bilden, wie man sie aus Studien an Nagetieren kennt (Imamura et al., 2020) und wie wir sie in embryonalem OB vorfanden.

Neben der möglichen Assoziation zu fehlgeleiteten Axonen olfaktorischer Rezeptorneurone stellt der Verlust der Mitralzellen angesichts der wichtigen Funktion in der Weiterleitung olfaktorischer Signale darüber hinaus ein mögliches histopathologisches Korrelat altersbedingten Geruchsverlustes dar. Einschränkend sollte jedoch erwähnt werden, dass in der vorgestellten Studie weder eine quantitative Bestimmung der ektopen Glomeruli noch der Mitralzellen durchgeführt werden konnte. Grund hierfür war, dass die Etablierung einer entsprechenden Färbung humaner Mitralzellen nicht in ausreichender Qualität für eine quantitative Analyse gelang und einzelne ektope Glomeruli nicht klar voneinander differenziert werden konnten. Eine potenzielle Korrelation von Mitralzellen und ektopen Glomeruli sollte daher in zukünftigen Studien untersucht werden, um die hier aufgestellten Hypothesen zu untersuchen.

3.2.1.2 Quantitative Veränderungen der glomerulären Zellschicht im Alter und die Korrelation des neurogenen Status des olfaktorischen Epithels mit dem neurogenen Status des olfaktorischen Bulbus

Wie bereits beschrieben, projizieren Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone afferent aus dem OE in den OB und bilden dort in den Glomeruli Synapsen mit sekundären Sinneszellen (Buck & Axel, 1991; Shepherd & Shepherd, 2004). Ein Verlust von olfaktorischen Rezeptorneuronen im OE führt entsprechend zu einer Reduktion der sensorischen Innervation des OBs (Child et al., 2018). Die Anzahl der Glomeruli, ihrer synaptischen Verbindungen und der glomeruläre Durchmesser können daher als Indikatoren für die Integrität der axonalen Projektion aus der Peripherie in zentrale Strukturen genutzt werden (Richard et al., 2010).

Aufgrund der identifizierten Reduktion reifer olfaktorischer Rezeptorneurone mit zunehmendem Alter vermuteten wir konsekutiv einen altersabhängigen Verlust der Glomeruli beziehungsweise ihrer Synapsen. Angesichts der Schwierigkeit, im humanen Gewebe Glomeruli voneinander abzugrenzen, berechneten wir anstelle der Anzahl einzelner Glomeruli die Fläche positiver VGlut2-Färbung als Korrelat der glomerulären Fläche innerhalb eines Bulbus. Mit zunehmendem Alter beobachteten wir entsprechend unserer Ausgangshypothese

eine signifikante Abnahme der positiven VGlut2-Färbung, also eine Reduktion der Synapsen innerhalb der Glomeruli und damit ein weiteres potenzielles histopathologisches Korrelat für altersbedingten Geruchsverlust. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da vorangegangene Studien an murinen und menschlichen OBs eine stabile glomeruläre Dichte mit zunehmendem Alter postulierten (Meisami et al., 1998; Maresh et al., 2008; Richard et al., 2010). Der Grund für dieses abweichende Ergebnis liegt vermutlich in der verwendeten Messmethodik. So wurde in Studien, in denen keine Abnahme der Glomeruli mit zunehmendem Alter festgestellt wurde, durch manuelles Auszählen die Anzahl der vorhandenen Glomeruli bestimmt, nicht jedoch die Dicke der Glomeruli oder die in ihnen enthaltenen synaptischen Verbindungen.

Wie bereits in der Maus gezeigt (Richard et al., 2010) scheint demnach auch im Menschen viel mehr die synaptische Dichte innerhalb der Glomeruli, als die Anzahl der Glomeruli selbst im Alter abzunehmen. Passend hierzu zeigte eine tierexperimentelle Studie (Richard et al., 2010) zwar eine stabile Anzahl an Glomeruli mit zunehmendem Alter, innerhalb der Glomeruli ergab sich jedoch ein Verlust der Synapsendichte zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen und Mitralzellen. Die in der vorgestellten Studie gewählte Methode (Fläche positiver VGlut2-Färbung) führt daher zu einer genaueren Abbildung der glomerulären Innervation des Bulbus, sodass in zukünftigen Studien möglicherweise nicht die Anzahl der Glomeruli, sondern ihr Durchmesser oder die von ihnen eingenommene Fläche (Fläche positiver VGlut2-Fläche) ein geeigneterer Surrogatparameter für die Bestimmung der neuronalen Innervation des Bulbus wäre.

Abgesehen von der beschriebenen desorganisierten Anordnung der adulten Glomeruli und dem Verlust der synaptischen Dichte im Alter fiel in der Studie konsistent mit einer früheren Autopsiestudie (Zapiec et al., 2017) auf, dass die Verteilung der Glomeruli im adulten OB ungleichmäßig war und in der ventralen Hälfte überwog. Daher analysierten wir die glomeruläre Fläche in Abhängigkeit des Alters getrennt für die ventrale und dorsale Seite des OBs. Während wir eine Abnahme der Fläche der ventralen VGlut2-Färbung in Abhängigkeit vom Alter beobachten konnten, zeigte sich die bereits ohnehin geringere Fläche der dorsalen VGlut2-Färbung unabhängig vom Alter konstant. Wie auch im OE ist die ventrale Seite des Bulbus aufgrund der Nähe zum OE, exponierter gegenüber der in der Atemluft enthaltenen Toxine und schädlichen Erreger. Das Eintreten von Xenobiotika wie Viren (Poliomyelitis-, Adeno-, Influenza-A-Viren) oder Metallen (Gold, Zink, Nickel) über das OE und den N. olfactorius in das ZNS ist gut untersucht und wird in der Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen als „olfactory vector hypothesis“ diskutiert (Doty, 2008). Folglich könnte die Akkumulation von Infektionen/Intoxikationen im Laufe des Lebens zum Verlust ventraler Glomeruli im Alter geführt haben. Darüber hinaus benötigen Bereiche, welche während des Lebens keinen hohen Turnover erfahren (dorsaler Bulbus), weniger neurogene

Regeneration und sind daher möglicherweise weniger von Veränderungen der neurogenen Regenerationsfähigkeit im Alter betroffen, was zusätzlich die stabile Innervationsdichte der dorsalen Bereiche des OE und auch des OBs erklären könnte.

Nicht zuletzt ist die Abnahme der Innervation des ventralen Bulbus möglicherweise aber auch sekundär durch Veränderung der in den Bulbus projizierenden ventralen olfaktorischen Rezeptorneurone bedingt, welche, wie wir in der Analyse gesamter Schleimhautblätter zeigen konnten, im Alter tendenziell abnehmen. Untersuchungen an Nagetieren ergaben, dass spezifische Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone in feste Regionen des OBs projizieren (Mori et al., 2000; Potter et al., 2001; Maresh et al., 2008; Richard et al., 2010). Entsprechend könnten die im Alter gut erhaltenen dorsalen Glomeruli durch die besser geschützten olfaktorischen Rezeptorneurone des dorsalen olfaktorischen Epithels innerviert werden, die abnehmenden ventralen Glomeruli hingegen durch die gleichfalls reduzierten ventralen olfaktorischen Rezeptorneurone. Um zu ermitteln, ob sich Informationen über den neuronalen Status der olfaktorischen Peripherie tatsächlich auf den neuronalen Status des ZNS übertragen lassen, analysierten wir die Nervenzellen der Riechepithelien und Bulbi, die aus ein und demselben Individuum stammten. Aufgrund der signifikanten Abnahme der VGluT2-Färbung (Korrelat für Glomeruli) innerhalb der ventralen Bulbushälfte als Funktion des Alters verglichen wir hierzu die Anzahl olfaktorischer Rezeptorneurone des OEs und die Menge glomerulärer Färbung des ventralen Bulbus innerhalb eines Individuums. Dabei identifizierten wir eine positive Korrelation zwischen der Anzahl reifer olfaktorischer Rezeptorneurone im OE und der Fläche positiver VGluT2-Färbung des zugehörigen ventralen OBs. Diese Daten zeigen erstmals, dass die Kenntnis des neuronalen Status der olfaktorischen Peripherie Rückschlüsse über den zentralen Teil der Geruchsverarbeitung erlaubt. Sie könnten möglicherweise im Rahmen von Geruchsstörungen oder neurodegenerativen Erkrankungen von Interesse sein, bei denen Schädigungen durch in der Atemluft enthaltene Xenobiotika als Ursache diskutiert werden (Doty, 2008). Veränderungen des OBs und OEs könnten frühzeitig auf eine Erkrankung hinweisen, noch bevor klinische Symptome auftreten. Einschränkend sollte jedoch erwähnt werden, dass die hohe intraindividuelle Variabilität des menschlichen OEs, die auch in unserer histologischen Studie auffiel, eine standardisierte Messmethode zur Entnahme repräsentativer Proben des OEs erfordert, um das tatsächliche Ausmaß der vorhandenen degenerativen Veränderungen wahrheitsgetreu wiederzugeben und nicht nur einen zufällig gewählten Bereich des OEs widerzuspiegeln. Außerdem müssten zunächst Normwerte für verschiedene Altersgruppen etabliert und definiert werden, sofern dies bei der hohen intraindividuellen Variabilität möglich ist.

3.3 Die histopathologischen Veränderungen des olfaktorischen Epithels und olfaktorischen Bulbus bei demenziellen Erkrankungen

Demenz ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch den progredienten Verlust kognitiver Teilfunktionen die unabhängige Lebensführung beeinträchtigt und weltweit ca. 55 Millionen Menschen betrifft (Geneva: World Health Organization, 2021). Trotz der weiten Verbreitung innerhalb der Bevölkerung und der damit einhergehenden Behinderung fehlt es neben validen Markern für eine frühzeitige Diagnosestellung noch immer an kurativen Therapieansätzen. Die Beeinträchtigung des Geruchssinns ist ein häufiges und frühes Symptom vieler neurodegenerativer Erkrankungen (Doty, 2012; Ruan et al., 2012; Barresi et al., 2012; Doty, 2017). So berichten ungefähr 85 % der Patienten/innen mit einer Alzheimerdemenz im Frühstadium von Geruchsstörungen (Y. Zou et al., 2016), weshalb diese als möglicher Biomarker für eine frühe Diagnosestellung diskutiert werden (Marin et al., 2018; Kondo et al., 2020). Es ist anzunehmen, dass die olfaktorische Dysfunktion bei neurodegenerativen Erkrankungen mit neuropathologischen Veränderungen der anatomischen Strukturen der Geruchsverarbeitung einhergeht. Untersuchungen des menschlichen OEs und OBs von demenzerkrankten Patienten/innen ergaben eine Häufung dystropher Neurome sowie das Vorkommen von Ablagerungen von Beta-Amyloid- und hyperphosphorylierten Tau (Arnold et al., 1998; Tsuboi et al., 2003; Attems et al., 2005; Beach et al., 2009; Attems et al., 2014). In unserer Studie konnten weder im OE noch im OB signifikante histopathologische Veränderungen in Bezug auf Demenz festgestellt werden. Als Ursache kommen hierfür vorrangig drei Punkte in Betracht. Zum einen verwendeten wir in unserer Studie keine spezifischen Marker wie Anti- β -Amyloid oder Tau, sondern allgemeine neuronale Marker, welche vermutlich nicht ausreichend sensitiv in der Erkennung krankheitsspezifischer Veränderungen sind. Zum anderen stützte sich unsere Analyse auf die begrenzten Informationen zu Begleiterkrankungen, die uns von den Autopsiezentren zur Verfügung gestellt wurden. Detaillierte Informationen lagen nicht vor, was möglicherweise zu einer Untererfassung von Demenz geführt und zu einer fehlenden Korrelation mit histologischen Veränderungen beigetragen haben könnte. Nicht zuletzt beschränkte sich unsere Fallzahl auf 15 Probanden/innen, wobei nur sechs eine spezifische Diagnose erhalten hatten (fünf mit Alzheimer-Demenz und eine Demenz bei idiopathischem Parkinsonsyndrom).

4 Limitationen

Obgleich uns dank der zur Verfügung stehenden Autopsiepräparate junger und adulter OEs und OBs eine umfangreiche Analyse des humanen olfaktorischen Geruchssystems möglich war, sollten bei der Interpretation der präsentierten Arbeit abschließend zwei allgemeine Limitationen berücksichtigt werden, die über die bereits diskutierten spezifischen Limitationen der einzelnen Analysen hinausgehen.

Zum einen ist die von uns untersuchte Stichprobe angesichts der Verfügbarkeit von Autopsieproben und dem natürlicherweise begrenzten Zugang zu jüngeren Proben auf das fortgeschrittene Erwachsenenalter ausgerichtet. In die quantitative Analyse des OEs und OBs gingen lediglich adulte Proben ein, während embryonale Autopsiepräparate ausschließlich qualitativ analysiert wurden. Die Entscheidung, die quantitative Analyse ausschließlich in adulten Proben durchzuführen, wurde aufgrund des Gedankens getroffen, quantitative Veränderungen im gealterten olfaktorischen System im Vergleich zum gesunden adulten System zu identifizieren, ohne durch Unterschiede zum sich entwickelnden embryonalen olfaktorischen System beeinflusst zu werden. Um eine statistisch bessere Aussage über altersbedingte Unterschiede treffen zu können, wäre ein größerer Stichprobenumfang an jungen Proben ideal gewesen.

Darüber hinaus sind die beobachteten histopathologischen Veränderungen des adulten Riechepithels wie die Reduktion des OEs und das Auftreten respiratorischer Metaplasie auch häufig in Epithelien normosomnischer Personen (Naessen, 1971; Paik et al., 1992; Holbrook et al., 2005; Witt et al., 2009) beschrieben und nicht auf Patienten/innen mit gestörter Geruchsfunktion beschränkt. Entsprechend ist eine direkte Korrelation solcher Veränderungen mit der olfaktorischen Funktion schwierig, zumal uns keine Informationen zur tatsächlichen Geruchsfunktion der Autopsiespender/innen vorlagen. In unserer Analyse stützten wir uns daher auf die gut dokumentierte Korrelation zwischen der abnehmenden Geruchsfunktion und dem zunehmenden Alter, die in früheren Studien belegt wurde (Doty et al., 1984; Hummel et al., 2007). Um die aufgestellten Hypothesen zu bestätigen, wäre es daher für folgende Studien interessant, die identifizierten histopathologischen Unterschiede mit der tatsächlichen Geruchsfunktion zu korrelieren.

5 Zusammenfassung

Hintergrund

Das menschliche olfaktorische Epithel ist dank Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb der Basalzellpopulation, die mit einer erhöhten Mitoserate und Regeneration von Epithelzellkomponenten auf Verletzungen oder neuronalen Verlust reagieren, zu lebenslanger Regeneration befähigt. Nichtsdestotrotz ist eine Beeinträchtigung des Geruchssinns im Alter und bei Demenzerkrankungen häufig. Etwa 80 % der über 80-jährigen und etwa 85 % der Patienten mit Alzheimer-Demenz im Frühstadium weisen eine Geruchsstörung auf. Diese ist mit einer Reduktion der allgemeinen Lebensqualität sowie gesteigerter Mortalität und psychischen Erkrankungen wie Depression und Angststörungen assoziiert. Veränderungen des histologischen Aufbaus der zugrunde liegenden anatomischen Strukturen sind anzunehmen und vorrangig für das olfaktorische Epithel (OE) weniger den olfaktorischen Bulbus (OB) beschrieben. Das Wissen über den Aufbau des menschlichen Geruchssystems und seine Veränderungen im Alter beruht jedoch auf Ergebnissen weniger deskriptiver Studien menschlicher Gewebeproben und überwiegend auf Erkenntnissen aus dem Modelltier Maus. Wenngleich murine Studien maßgeblich zu einem besseren Verständnis des Geruchssystems beigetragen haben, weist die Maus als Modelltier deutliche strukturelle Unterschiede zum Menschen auf. Detaillierte quantitative Analysen des menschlichen Geruchssystems fehlen weitestgehend.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das menschliche Geruchssystem durch eine umfangreiche qualitative und quantitative Analyse menschlicher Autopsiepräparate des olfaktorischen Epithels (OE) und olfaktorischen Bulbus (OB) zu charakterisieren und histopathologische Veränderungen über die Lebensspanne und bei Demenzerkrankungen zu beschreiben.

Material und Methoden

Zur histologischen Charakterisierung verwendeten wir Autopsieproben des OEs und OBs von 36 Probanden/innen, einschließlich embryonalen Gewebes. In die quantitative Analyse gingen adulte Epithelien von Probanden/innen mit einem durchschnittlichen Alter von 74 Jahren (28-92 Jahre) ein. Verschiedene Komponenten des OEs und OBs wurden immunhistochemisch angefärbt und insbesondere in Bezug auf Veränderungen im Alter und bei Demenz analysiert. Im OE untersuchten wir die neuronale Ausreifung, den Anteil spezifischer Epitheltypen (respiratorisches, neuronales, gemischtes Epithel), die Anzahl und Art subepithelialer Zysten (neuronale, respiratorische und gemischte Zysten) innerhalb der Lamina propria, den Anteil der Neurome am Gesamtepithel sowie die Anzahl proliferierender Basalzellen. Die immunhistochemische Analyse des OBs umfasste die Mitralzellen, periglomeruläre Zellen und

Glomeruli sowie die quantitative Bestimmung der OB-Länge des OB-Volumens und der glomerulären Fläche innerhalb des Bulbus.

Ergebnisse

In der qualitativen Analyse des adulten OEs zeigte sich im Vergleich mit embryonalen Proben eine Abnahme der Epitheldicke sowie eine neuronale Verarmung, während respiratorische Metaplasie, Neurome und submuköse Zysten im Alter zuzunehmen schienen. Die quantitative Analyse ergab eine Abnahme der Gesamtfläche des OEs, eine Reduktion ausgereifter olfaktorischer Rezeptorneurone sowie eine Tendenz zum Verlust proliferierender basaler Stammzellen mit zunehmendem Alter. Zusätzlich zeigte sich eine Zunahme an gemischtem Epithel, welches sich aus respiratorischen Zellen und Nervenzellen zusammensetzt. Das Ausmaß der respiratorischen Metaplasie und neuronalen Verarmung korrelierten weiterhin mit dem Vorhandensein submuköser Zysten. Die Anzahl an Neuromen tendierte im Alter zuzunehmen.

Im Bulbus olfactorius zeigte sich in der qualitativen Analyse von adulten im Vergleich zu embryonalen Proben eine Reduktion der glomerulären- und Mitralzellschicht. Während im Embryo eine durchgehende Mitralzellschicht identifiziert werden konnte, fanden sich im adulten Gewebe nur vereinzelte Mitralzellen. Die quantitative Analyse ergab neben einem ungleichen Verhältnis der glomerulären Innervation innerhalb des Bulbus eine Abnahme des Bulbusvolumens sowie einen Verlust der glomerulären Innervation mit zunehmendem Alter.

Dank der Möglichkeit, die OEs und die dazugehörigen OBs eines Individuums zu untersuchen, konnten wir erstmals zeigen, dass Veränderungen der olfaktorischen Peripherie im einzelnen Individuum Rückschlüsse auf den neuronalen Status des OB erlauben. So korrelierte innerhalb eines Individuums die Anzahl reifer olfaktorischer Rezeptorneurone des OEs mit dem glomerulären Gesamtvolumen des zugehörigen ventralen OBs. Histopathologische Veränderungen in Abhängigkeit einer Demenzerkrankung ergaben sich in unserer Analyse nicht.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere histopathologische Veränderungen im OE und OB identifiziert werden, die potenzielle Korrelate für altersbedingte Geruchsstörungen darstellen. Die beobachtete Abnahme der olfaktorischen Rezeptorneurone in Abhängigkeit vom Alter, die sich in einer Verringerung der glomerulären Synapsen widerspiegelte, könnte dafür sprechen, dass für eine ausreichende Geruchswahrnehmung eine kritische Masse innervierender olfaktorischer Rezeptorneurone erforderlich ist, die möglicherweise im Alter unterschritten wird. Ob die zugrunde liegende Ursache für diesen Verlust in der olfaktorischen Peripherie liegt oder zentral begründet ist und sich als peripherer neuronaler Verlust manifestiert, ist

unklar. Die Beobachtung von respiratorischer Metaplasie, neuronalem Verlust und der Tendenz zum Rückgang proliferierender Basalzellen lässt vermuten, dass eine fortschreitende Ruhe der Stammzellen möglicherweise an der Pathophysiologie des altersbedingten Geruchsverlustes des Menschen beteiligt ist. Um die aufgestellten Hypothesen zu bestätigen, wäre es interessant, in kommenden Studien die identifizierten histopathologischen Unterschiede mit der tatsächlichen Geruchsfunktion zu korrelieren.

6 Summary

Background

The human olfactory epithelium is capable of lifelong regeneration thanks to stem and progenitor cells within the basal cell population that respond to injury or neuronal loss with increased mitotic rates and regeneration of epithelial cell components. Nonetheless, olfactory impairment is common in the elderly and in dementia. About 80% of patients over 80 years of age and about 85% of patients with early-stage Alzheimer's dementia exhibit olfactory impairment. This is associated with a reduction in overall quality of life as well as increased mortality and mental illness, such as depression and anxiety disorders. Changes in the histological structure of the underlying anatomical structures in the sense of histopathological correlates are expected and have been described primarily for the olfactory epithelium, rather than the bulb. However, knowledge about the structure of the human olfactory system and its alterations in aging is based on the results of few descriptive studies of human tissue samples and predominantly on findings from the mouse. Although these have contributed significantly to a better understanding of the olfactory system, the mouse as a model has distinct structural differences from humans. Detailed quantitative analyses of the human olfactory system are largely lacking.

The aim of this work was to characterize the human olfactory system by an extensive qualitative and quantitative analysis of human autopsy preparations of the olfactory epithelium (OE) and olfactory bulb (OB) and to describe histopathological changes over the lifespan and in dementia.

Materials and Methods

For immunohistochemical analysis, we used autopsy specimens of olfactory epithelium (OEs) and olfactory bulb (OBs) from 36 subjects, including embryonic tissues. In the quantitative analysis, adult epithelia from specimens with a mean age of 74 (28-92) were included. Various components of the OEs and OBs were immunohistochemically stained and analyzed in relation to age and dementia. In the OE, we examined neuronal maturation, the proportion of specific epithelial types (respiratory, neuronal, mixed epithelium), the number and type of subepithelial cysts (neuronal, respiratory, and mixed cysts) within the lamina propria, the proportion of neuromas in the total epithelium, and the number of proliferating basal cells. Immunohistochemical analysis of the OB included mitral cells, periglomerular cells, and glomeruli, as well as quantitative determination of OB length, OB volume, and glomerular area within the bulb.

Results

The qualitative analysis of adult OE showed a decrease in epithelial thickness and neuronal depletion compared with embryonic samples, whereas respiratory metaplasia, neuromas, and submucosal cysts appeared to increase with age. Quantitative analysis revealed a decrease in total OE area, a reduction in mature olfactory receptor neurons, and a tendency toward loss of proliferating basal stem cells with age. In addition, there was an increase in mixed epithelium composed of respiratory cells and neurons. The extent of respiratory metaplasia and neuronal depletion further correlated with the presence of submucosal cysts. The number of neuromas tended to increase with age.

In the olfactory bulb, a reduction in the glomerular and mitral cell layer appeared in the qualitative analysis of adults compared with embryonic samples. Whereas a continuous mitral cell layer could be identified in the embryo, in the adult tissue mitral cells appeared only scattered over the plexiform layer. Quantitative analysis revealed unequal glomerular innervation of the bulb, a decrease in bulb volume, and a loss of glomerular synapses with age.

Thanks to the ability to examine the OEs and the corresponding OBs of one individual, we were able to show for the first time that changes in the olfactory periphery allow conclusions about the neuronal status of the OB in a single individual. Thus, within an individual, the number of mature olfactory receptor neurons of the OE correlated with the total glomerular volume of the associated ventral OB. Histopathologic changes dependent on dementia were not found in our analysis.

Conclusion

The present work identified several histopathological changes in the OE and OB that are potential correlates for age-related olfactory dysfunction. The observed decrease in olfactory receptor neurons as a function of age, which was reflected in a reduction in glomerular synapses, may suggest that a critical mass of innervating olfactory receptor neurons is required for adequate odor perception, which may be undercut in old age. Whether the underlying cause of this loss is situated in the olfactory periphery or is centrally based, manifesting as peripheral neuronal loss, is unclear. The observation of respiratory metaplasia, neuronal loss, and the tendency for proliferating basal cells to decline suggests that progressive stem cell quiescence may be involved in the pathophysiology of age-related olfactory loss in humans. To confirm the hypotheses raised, it would be intriguing to correlate the identified histopathologic differences with actual olfactory function in upcoming studies.

7 Literaturverzeichnis

- Ajmani, G. S., Suh, H. H., Wroblewski, K. E., Kern, D. W., Schumm, L. P., McClintock, M. K., Yanosky, J. D., & Pinto, J. M. (2016). Fine particulate matter exposure and olfactory dysfunction among urban-dwelling older US adults. *Environmental Research*, 151, 797–803. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.012>
- Araneda, R. C., Kini, A. D., & Firestein, S. (2000). The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1248–1255. <https://doi.org/10.1038/81774>
- Arnold, S. E., Smutzer, G. S., Trojanowski, J. Q., & Moberg, P. J. (1998). Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 762–775. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10656.x>
- Aros, C. J. (2022). Indirect Immunofluorescence (IF) of Tissue Sections. In A. T. Ooi (Ed.), *Single-Cell Protein Analysis: Methods and Protocols* (pp. 17–26). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1771-7_2
- Attems, J., Lintner, F., & Jellinger, K. A. (2005). Olfactory involvement in aging and Alzheimer's disease: An autopsy study. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 7(2), 149–157; discussion 173–180. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7208>
- Attems, J., Walker, L., & Jellinger, K. A. (2014). Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 127(4), 459–475. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1261-7>
- Attems, J., Walker, L., & Jellinger, K. A. (2015). Olfaction and Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 61(6), 485–490. <https://doi.org/10.1159/000381619>
- Baier, H., & Korsching, S. (1994). Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *The Journal of Neuroscience*, 14(1), 219–230. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00219.1994>
- Barresi, M., Ciurleo, R., Giacoppo, S., Foti Cuzzola, V., Celi, D., Bramanti, P., & Marino, S. (2012). Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 323(1–2), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.08.028>
- Beach, T. G., White, C. L., Hladik, C. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Shill, H. A., Sue, L. I., Sasse, J., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Akiyama, H., & Adler, C. H. (2009). Olfactory bulb α -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta*

Neuropathologica, 117(2), 169–174. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0450-7>

Bhatia-Dey, N., & Heinbockel, T. (2021). The Olfactory System as Marker of Neurodegeneration in Aging, Neurological and Neuropsychiatric Disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136976>

Bhatnagar, K. P., Kennedy, R. C., Baron, G., & Greenberg, R. A. (1987). Number of mitral cells and the bulb volume in the aging human olfactory bulb: A quantitative morphological study. *The Anatomical Record*, 218(1), 73–87. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180112>

Blomkvist, A., & Hofer, M. (2021). Olfactory Impairment and Close Social Relationships. A Narrative Review. *Chemical Senses*, 46, bjab037. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjab037>

Brann, J. H., Ellis, D. P., Ku, B. S., Spinazzi, E. F., & Firestein, S. (2015). Injury in aged animals robustly activates quiescent olfactory neural stem cells. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00367>

Bratthauer, G. L. (2010). The Avidin–Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin–Biotin Binding Methods. In C. Oliver & M. C. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (pp. 257–270). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_26

Breer, H. (2003). Olfactory receptors: Molecular basis for recognition and discrimination of odors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2113-9>

Breipohl, W., Laugwitz, H. J., & Bornfeld, N. (1974). Topological relations between the dendrites of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, 117(Pt 1), 89–94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231436/pdf/janat00384-0093.pdf>

Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175–187. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-x)

Buschhüter, D., Smitka, M., Puschmann, S., Gerber, J. C., Witt, M., Abolmaali, N. D., & Hummel, T. (2008). Correlation between olfactory bulb volume and olfactory function. *NeuroImage*, 42(2), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.004>

Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., & Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6177), 1370–1372.

<https://doi.org/10.1126/science.1249168>

Calof, A. L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawauchi, S., Murray, R. C., Shou, J., & Wu, H.-H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microscopy Research and Technique*, 58(3), 176–188. <https://doi.org/10.1002/jemt.10147>

Chen, M., Reed, R. R., & Lane, A. P. (2019). Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense. *Cell Stem Cell*, 25(4), 501–513.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.011>

Child, K. M., Herrick, D. B., Schwob, J. E., Holbrook, E. H., & Jang, W. (2018). The Neuroregenerative Capacity of Olfactory Stem Cells Is Not Limitless: Implications for Aging. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(31), 6806–6824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3261-17.2018>

Cleland, T. A., & Linster, C. (2019). Central olfactory structures. *Handbook of Clinical Neurology*, 164, 79–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00006-X>

Costanzo, R. M., & Kobayashi, M. (2010). Age-Related Changes in P2 Odorant Receptor Mapping in the Olfactory Bulb. *Chemical Senses*, 35(5), 417–426. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq029>

Croy, I., Nordin, S., & Hummel, T. (2014). Olfactory disorders and quality of life—An updated review. *Chemical Senses*, 39(3), 185–194. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt072>

Çullu, N., Yeniçeri, İ. Ö., Güney, B., Özdemir, M. Y., & Koşar, İ. (2020). Evaluation of olfactory bulbus volume and olfactory sulcus depth by 3 T MR. *Surgical and Radiologic Anatomy: SRA*, 42(9), 1113–1118. <https://doi.org/10.1007/s00276-020-02484-w>

Cummings, D. M., Emge, D. K., Small, S. L., & Margolis, F. L. (2000). Pattern of olfactory bulb innervation returns after recovery from reversible peripheral deafferentation. *Journal of Comparative Neurology*, 421(3), 362–373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000605\)421:3<362::AID-CNE5>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000605)421:3<362::AID-CNE5>3.0.CO;2-8)

de Lorenzo, A. J. (1957). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(6), 839–850. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.6.839>

DelGaudio, J. M., & Panella, N. J. (2016). Presbynasalis. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 6(10), 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/alr.21787>

Donaldson, J. G. (1998). Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*,

00(1), 4.3.1-4.3.6. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s00>

Doty, R. L. (2008). The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? *Annals of Neurology*, 63(1), 7–15. <https://doi.org/10.1002/ana.21327>

Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews. Neurology*, 8(6), 329–339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>

Doty, R. L. (2017). Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: Is there a common pathological substrate? *The Lancet. Neurology*, 16(6), 478–488. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30123-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30123-0)

Doty, R. L., & Kamath, V. (2014). The influences of age on olfaction: A review. *Frontiers in Psychology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00020>

Doty, R. L., Shaman, P., Applebaum, S. L., Giberson, R., Siksorski, L., & Rosenberg, L. (1984). Smell identification ability: Changes with age. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4681), 1441–1443. <https://doi.org/10.1126/science.6505700>

Douek, E., Bannister, L. H., & Dodson, H. C. (1975). Recent advances in the pathology of olfaction. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 68(8), 467–470. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1863864/pdf/procrsmed00041-0011.pdf>

Dunkenberger, L., & Del Valle, L. (2022). Antigen Retrieval and Signal Amplification. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2422, 65–74. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_5

Durante, M. A., Kurtenbach, S., Sargi, Z. B., Harbour, J. W., Choi, R., Kurtenbach, S., Goss, G. M., Matsunami, H., & Goldstein, B. J. (2020). Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans. *Nature Neuroscience*, 23(3), 323–326. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0587-9>

Faedo, A., Ficara, F., Ghiani, M., Aiuti, A., Rubenstein, J. L. R., & Bulfone, A. (2002). Developmental expression of the T-box transcription factor T-bet/Tbx21 during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 116(1), 157–160. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00114-4)

Feinstein, P., & Mombaerts, P. (2004). A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117(6), 817–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.011>

Feng, W.-H., Kauer, J. S., Adelman, L., & Talamo, B. R. (1997). New structure, the “olfactory pit,” in human olfactory mucosa. *Journal of Comparative Neurology*, 378(4), 443–453.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970224\)378:4<443::AID-CNE1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<443::AID-CNE1>3.0.CO;2-2)

Féron, F., Perry, C., McGrath, J. J., & Mackay-Sim, A. (1998). New Techniques for Biopsy and Culture of Human Olfactory Epithelial Neurons. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 124(8), 861. <https://doi.org/10.1001/archotol.124.8.861>

Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E., & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 530(12), 2154–2175. <https://doi.org/10.1002/cne.25325>

Gabellec, M.-M., Panzanelli, P., Sassoè-Pognetto, M., & Lledo, P.-M. (2007). Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 25(5), 1373–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05400.x>

Geneva: World Health Organization. (2021). *Global status report on the public health response to dementia*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240033245>

Glezer, I., & Malnic, B. (2019). Chapter 5—Olfactory receptor function. In R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 164, pp. 67–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00005-8>

Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., & Lancet, D. (2001). The complete human olfactory subgenome. *Genome Research*, 11(5), 685–702. <https://doi.org/10.1101/gr.171001>

Godfrey, P. A., Malnic, B., & Buck, L. B. (2004). The mouse olfactory receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2156–2161. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308051100>

Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(9), 628–641. <https://doi.org/10.1038/nrn2883>

Graziadei, P. P. C., & Samanen, D. W. (1980). Ectopic glomerular structures in the olfactory bulb of neonatal and adult mice. *Brain Research*, 187(2), 467–472. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90217-6)

Graziadei, P. P., & Monti Graziadei, A. G. (1983). Regeneration in the olfactory system of vertebrates. *American Journal of Otolaryngology*, 4(4), 228–233. [https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(83\)80063-5](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(83)80063-5)

Gudis, D. A., & Cohen, N. A. (2010). Cilia Dysfunction. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 43(3), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.02.007>

- Hadley, K., Orlandi, R. R., & Fong, K. J. (2004). Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6), 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2004.06.009>
- Håglin, S., Berghard, A., & Bohm, S. (2020). Increased Retinoic Acid Catabolism in Olfactory Sensory Neurons Activates Dormant Tissue-Specific Stem Cells and Accelerates Age-Related Metaplasia. *Journal of Neuroscience*, 40(21), 4116–4129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2468-19.2020>
- Hahn, C.-G., Han, L.-Y., Rawson, N. E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R. H., & Arnold, S. E. (2005). In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 483(2), 154–163. <https://doi.org/10.1002/cne.20424>
- Hatt, H. (2004). Molecular and cellular basis of human olfaction. *Chemistry & Biodiversity*, 1(12), 1857–1869. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490142>
- Heydel, J.-M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A.-M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J., & Briand, L. (2013). Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: Implications in olfactory perireceptor events. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 296(9), 1333–1345. <https://doi.org/10.1002/ar.22735>
- Hinds, J. W., & McNelly, N. A. (1981). Aging in the rat olfactory system: Correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 203(3), 441–453. <https://doi.org/10.1002/cne.902030308>
- Hirata, T., Shioi, G., Abe, T., Kiyonari, H., Kato, S., Kobayashi, K., Mori, K., & Kawasaki, T. (2019). A Novel Birthdate-Labeling Method Reveals Segregated Parallel Projections of Mitral and External Tufted Cells in the Main Olfactory System. *eNeuro*, 6(6). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0234-19.2019>
- Holbrook, E. H., Iwema, C. L., Peluso, C. E., & Schwob, J. E. (2014). The Regeneration of P2 Olfactory Sensory Neurons Is Selectively Impaired Following Methyl Bromide Lesion. *Chemical Senses*, 39(7), 601–616. <https://doi.org/10.1093/chemse/bju033>
- Holbrook, E. H., Leopold, D. A., & Schwob, J. E. (2005). Abnormalities of Axon Growth in Human Olfactory Mucosa. *The Laryngoscope*, 115(12), 2144–2154. <https://doi.org/10.1097/01.MLG.0000181493.83661.CE>
- Holbrook, E. H., Rebeiz, L., & Schwob, J. E. (2016). Office-based olfactory mucosa biopsies. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 6(6), 646–653. <https://doi.org/10.1002/alr.21711>

- Holbrook, E. H., Wu, E., Curry, W. T., Lin, D. T., & Schwob, J. E. (2011). Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *The Laryngoscope*, 121(8), 1687–1701. <https://doi.org/10.1002/lary.21856>
- Hoogland, P. V., Berg, R. V. D., & Huisman, E. (2003). Misrouted olfactory fibres and ectopic olfactory glomeruli in normal humans and in Parkinson and Alzheimer patients. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(3), 303–311. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00459.x>
- Huard, J. M. T., & Schwob, J. E. (1995). Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Developmental Dynamics*, 203(1), 17–26. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030103>
- Huard, J. M. T., Youngentob, S. L., Goldstein, B. J., Luskin, M. B., & Schwob, J. E. (1998). Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *Journal of Comparative Neurology*, 400(4), 469–486. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19981102\)400:4<469::AID-CNE3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981102)400:4<469::AID-CNE3>3.0.CO;2-8)
- Huart, C., Rombaux, P., & Hummel, T. (2013). Plasticity of the Human Olfactory System: The Olfactory Bulb. *Molecules*, 18(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules180911586>
- Hummel, T., Kobal, G., Gudziol, H., & Mackay-Sim, A. (2007). Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: An upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 264(3), 237–243. <https://doi.org/10.1007/s00405-006-0173-0>
- Hummel, T., Urbig, A., Huart, C., Duprez, T., & Rombaux, P. (2015). Volume of olfactory bulb and depth of olfactory sulcus in 378 consecutive patients with olfactory loss. *Journal of Neurology*, 262(4), 1046–1051. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7691-x>
- Hummel, T., Whitcroft, K. L., Andrews, P., Altundag, A., Cinghi, C., Costanzo, R. M., Damm, M., Frasnelli, J., Gudziol, H., Gupta, N., Haehne, A., Holbrook, E., Hong, S. C., Hornung, D., Hüttenbrink, K. B., Kamel, R., Kobayashi, M., Konstantinidis, I., Landis, B. N., ... Welge-Luessen, A. (2017). Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinology. Supplement*, 54(26), 1–30. <https://doi.org/10.4193/Rhino16.248>
- Hüttenbrink, K.-B., Hummel, T., Berg, D., Gasser, T., & Hähner, A. (2013). Olfactory dysfunction: Common in later life and early warning of neurodegenerative disease. *Deutsches Arzteblatt International*, 110(1–2), 1–7, e1. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0001>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In W. H. Yong (Ed.), *Biobanking: Methods and Protocols* (pp.

299–311). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

Imamura, F., Ito, A., & LaFever, B. J. (2020). Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Frontiers in Neural Circuits*, 14, 561822. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822>

Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., & Sakano, H. (2001). Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(1), 71–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00398.x>

Iwai, N., Zhou, Z., Roop, D. R., & Behringer, R. R. (2008). Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(5), 1298–1306. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0891>

Jafek, B. W., Eller, P. M., Esses, B. A., & Moran, D. T. (1989). Post-traumatic anosmia. Ultrastructural correlates. *Archives of Neurology*, 46(3), 300–304. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520390066018>

Jang, W., Youngentob, S. L., & Schwob, J. E. (2003). Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(1), 123–140. <https://doi.org/10.1002/cne.10642>

Jia, C., & Hegg, C. C. (2015). Effect of IP3R3 and NPY on age-related declines in olfactory stem cell proliferation. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 1045–1056. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.007>

Johansson, B. G., & Jones, T. M. (2007). The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 82(2), 265–289. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00009.x>

Jones, D. T., & Reed, R. R. (1989). Golf: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4906), 790–795. <https://doi.org/10.1126/science.2499043>

Kalmey, J. K., Thewissen, J. g. m., & Dluzen, D. E. (1998). Age-related size reduction of foramina in the cribriform plate. *The Anatomical Record*, 251(3), 326–329. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199807\)251:3<326::AID-AR7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199807)251:3<326::AID-AR7>3.0.CO;2-T)

Kauer, J. S., & Cinelli, A. R. (1993). Are there structural and functional modules in the vertebrate olfactory bulb? *Microscopy Research and Technique*, 24(2), 157–167.

<https://doi.org/10.1002/jemt.1070240207>

Kay, L. M., & Sherman, S. M. (2007). An argument for an olfactory thalamus. *Trends in Neurosciences*, 30(2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.11.007>

Ke, M.-T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013). SeeDB: A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience*, 16(8), 1154–1161. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>

Kikuta, S., Fletcher, M. L., Homma, R., Yamasoba, T., & Nagayama, S. (2013). Odorant response properties of individual neurons in an olfactory glomerular module. *Neuron*, 77(6), 1122–1135. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.022>

Kimura, M., Umehara, T., Udagawa, J., Kawauchi, H., & Otani, H. (2009). Development of olfactory epithelium in the human fetus: Scanning electron microscopic observations. *Congenital Anomalies*, 49(3), 102–107. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2009.00233.x>

Kondo, K., Kikuta, S., Ueha, R., Suzukawa, K., & Yamasoba, T. (2020). Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 208. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00208>

Kondo, K., Watanabe, K., Sakamoto, T., Suzukawa, K., Nibu, K., Kaga, K., & Yamasoba, T. (2009). Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman's glands in mouse olfactory mucosa: Age-related progression. *Cell and Tissue Research*, 335(3), 489–503. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0739-9>

Landis, B. N., Hummel, T., Hugentobler, M., Giger, R., & Lacroix, J. S. (2003). Ratings of overall olfactory function. *Chemical Senses*, 28(8), 691–694. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjg061>

Laska, M., & Hübener, F. (2001). Olfactory discrimination ability for homologous series of aliphatic ketones and acetic esters. *Behavioural Brain Research*, 119(2), 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00348-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00348-X)

Leopold, D. A., Hummel, T., Schwob, J. E., Hong, S. C., Knecht, M., & Kobal, G. (2000). Anterior Distribution of Human Olfactory Epithelium. *The Laryngoscope*, 110(3), 417–421. <https://doi.org/10.1097/00005537-200003000-00016>

Leopold, D. A., Loehrl, T. A., & Schwob, J. E. (2002). Long-term follow-up of surgically treated phantosmia. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 128(6), 642–647. <https://doi.org/10.1001/archotol.128.6.642>

- Leung, C. T., Coulombe, P. A., & Reed, R. R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature Neuroscience*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nn1882>
- Li, X., Tong, M., Wang, L., Qin, Y., Yu, H., & Yu, Y. (2020). Age-Dependent Activation and Neuronal Differentiation of Lgr5+ Basal Cells in Injured Olfactory Epithelium via Notch Signaling Pathway. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 602688. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.602688>
- Lodovichi, C. (2021). Topographic organization in the olfactory bulb. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 457–472. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03348-w>
- Loo, A. T., Youngentob, S. L., Kent, P. F., & Schwob, J. E. (1996). The aging olfactory epithelium: Neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(7), 881–900. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(96\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(96)00046-9)
- Lu, R., Aziz, N. A., Reuter, M., Stöcker, T., & Breteler, M. M. B. (2021). Evaluation of the Neuroanatomical Basis of Olfactory Dysfunction in the General Population. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2021.2026>
- Ma, J., Rubin, B. K., & Voynow, J. A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*, 154(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>
- Malnic, B. (2007). Searching for the ligands of odorant receptors. *Molecular Neurobiology*, 35(2), 175–181. <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0013-2>
- Maresh, A., Rodriguez Gil, D., Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2008). Principles of Glomerular Organization in the Human Olfactory Bulb – Implications for Odor Processing. *PLoS ONE*, 3(7), e2640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002640>
- Marin, C., Vilas, D., Langdon, C., Alobid, I., López-Chacón, M., Haehner, A., Hummel, T., & Mullol, J. (2018). Olfactory Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(8), 42. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0796-4>
- McGann, J. P. (2017). Poor Human Olfaction is a Nineteenth Century Myth. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6338), eaam7263. <https://doi.org/10.1126/science.aam7263>
- Meisami, E., Mikhail, L., Baim, D., & Bhatnagar, K. P. (1998). Human Olfactory Bulb: Aging of Glomeruli and Mitral Cells and a Search for the Accessory Olfactory Bulba. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 708–715. <https://doi.org/10.1111/j.1749->

6632.1998.tb10649.x

- Miwa, T., Furukawa, M., Tsukatani, T., Costanzo, R. M., DiNardo, L. J., & Reiter, E. R. (2001). Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 127(5), 497–503. <https://doi.org/10.1001/archotol.127.5.497>
- Mobley, A. S., Rodriguez-Gil, D. J., Imamura, F., & Greer, C. A. (2014). Aging in the olfactory system. *Trends in Neurosciences*, 37(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.004>
- Mombaerts, P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 487–509. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.487>
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675–686. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81387-2)
- Monti-Graziadei, G. A., Margolis, F. L., Harding, J. W., & Graziadei, P. P. (1977). Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 25(12), 1311–1316. <https://doi.org/10.1177/25.12.336785>
- Moran, D. T., Rowley, J. C., Jafek, B. W., & Lovell, M. A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology*, 11(5), 721–746. <https://doi.org/10.1007/BF01153516>
- Mori, K., Nagao, H., & Yoshihara, Y. (1999). The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science*, 286(5440), 711–715. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.711>
- Mori, K., & Sakano, H. (2011). How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
- Mori, K., von Campenhouse, H., & Yoshihara, Y. (2000). Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 355(1404), 1801–1812. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0736>
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 23(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230105>
- Mueller, A., Rodewald, A., Reden, J., Gerber, J., von Kummer, R., & Hummel, T. (2005).

Reduced olfactory bulb volume in post-traumatic and post-infectious olfactory dysfunction. *NeuroReport*, 16(5), 475.

Murphy, C. (2002). Prevalence of Olfactory Impairment in Older Adults. *JAMA*, 288(18), 2307. <https://doi.org/10.1001/jama.288.18.2307>

Naessen, R. (1970). The Identification and Topographical Localisation of the Olfactory Epithelium in Man and Other Mammals. *Acta Oto-Laryngologica*, 70(1), 51–57. <https://doi.org/10.3109/00016487009181858>

Naessen, R. (1971). An Enquiry on the Morphological Characteristics and Possible Changes with Age in the Olfactory Region of Man. *Acta Oto-Laryngologica*, 71(1–6), 49–62. <https://doi.org/10.3109/00016487109125332>

Nagayama, S., Takahashi, Y. K., Yoshihara, Y., & Mori, K. (2004). Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 91(6), 2532–2540. <https://doi.org/10.1152/jn.01266.2003>

Nakashima, T., Kimmelman, C. P., & Snow, J. B. (1984). Structure of Human Fetal and Adult Olfactory Neuroepithelium. *Archives of Otolaryngology*, 110(10), 641–646. <https://doi.org/10.1001/archotol.1984.00800360013003>

Nakashima, T., Tanaka, M., Inamitsu, M., & Uemura, T. (1991). Immunohistopathology of variations of human olfactory mucosa. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 248(6), 370–375.

Nei, M., Niimura, Y., & Nozawa, M. (2008). The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: Roles of chance and necessity. *Nature Reviews Genetics*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrg2480>

Nibu, K., Li, G., Zhang, X., Rawson, N. E., Restrepo, D., Kaga, K., Lowry, L. D., Keane, W. M., & Rothstein, J. L. (1999). Olfactory neuron-specific expression of NeuroD in mouse and human nasal mucosa. *Cell and Tissue Research*, 298(3), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s004419900098>

Oliva, A. D., Gupta, R., Issa, K., Abi Hachem, R., Jang, D. W., Wellford, S. A., Moseman, E. A., Matsunami, H., & Goldstein, B. J. (2022). Aging-related olfactory loss is associated with olfactory stem cell transcriptional alterations in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(4), e155506. <https://doi.org/10.1172/JCI155506>

- Omura, K., Han, B., Nishijima, H., Aoki, S., Ebihara, T., Kondo, K., Otori, N., Kojima, H., Yamasoba, T., & Kikuta, S. (2022). Heterogeneous distribution of mature olfactory sensory neurons in human olfactory epithelium. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 12(3), 266–277. <https://doi.org/10.1002/alr.22885>
- Orona, E., Rainer, E. C., & Scott, J. W. (1984). Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 226(3), 346–356. <https://doi.org/10.1002/cne.902260305>
- Paik, S. I., Lehman, M. N., Seiden, A. M., Duncan, H. J., & Smith, D. V. (1992). Human Olfactory Biopsy: The Influence of Age and Receptor Distribution. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 118(7), 731–738. <https://doi.org/10.1001/archotol.1992.01880070061012>
- Patel, Z. M., Holbrook, E. H., Turner, J. H., Adappa, N. D., Albers, M. W., Altundag, A., Appenzeller, S., Costanzo, R. M., Croy, I., Davis, G. E., Dehgani-Mobaraki, P., Doty, R. L., Duffy, V. B., Goldstein, B. J., Gudis, D. A., Haehner, A., Higgins, T. S., Hopkins, C., Huart, C., ... Yan, C. H. (2022). International consensus statement on allergy and rhinology: Olfaction. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 12(4), 327–680. <https://doi.org/10.1002/alr.22929>
- Potter, S. M., Zheng, C., Koos, D. S., Feinstein, P., Fraser, S. E., & Mombaerts, P. (2001). Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9713–9723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09713.2001>
- Price, J. L. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 150(1), 87–108. <https://doi.org/10.1002/cne.901500105>
- Raithel, C. U., & Gottfried, J. A. (2021). Using your nose to find your way: Ethological comparisons between human and non-human species. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 128, 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.040>
- Ramos-Vara, J. A. (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. In J.-C. Gautier (Ed.), *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols* (pp. 115–128). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_5
- Redman, R. S. (1974). Nasopalatine duct cyst with pigmented lining suggestive of olfactory epithelium. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 37(3), 421–428. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(74\)90115-7](https://doi.org/10.1016/0030-4220(74)90115-7)

- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73(3), 597–609. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90145-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90145-g)
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: Evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 79(7), 1245–1255. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90015-9)
- Richard, M. B., Taylor, S. R., & Greer, C. A. (2010). Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), 15613–15618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007931107>
- Rombaux, P., Mouraux, A., Bertrand, B., Nicolas, G., Duprez, T., & Hummel, T. (2006). Retronasal and Orthonasal Olfactory Function in Relation to Olfactory Bulb Volume in Patients With Posttraumatic Loss of Smell. *The Laryngoscope*, 116(6), 901–905. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000217533.60311.e7>
- Rosli, Y., Breckenridge, L. J., & Smith, R. A. (1999). An ultrastructural study of age-related changes in mouse olfactory epithelium. *Journal of Electron Microscopy*, 48(1), 77–84.
- Ruan, Y., Zheng, X.-Y., Zhang, H.-L., Zhu, W., & Zhu, J. (2012). Olfactory dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 90(9), 1693–1700. <https://doi.org/10.1002/jnr.23054>
- Salazar, I., Sanchez-Quinteiro, P., Barrios, A. W., López Amado, M., & Vega, J. A. (2019). Chapter 4—Anatomy of the olfactory mucosa. In R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 164, pp. 47–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00004-6>
- Sarnat, H. B., & Flores-Sarnat, L. (2019). Chapter 3—Development of the human olfactory system. In R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 164, pp. 29–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00003-4>
- Schäfer, L., Schriever, V. A., & Croy, I. (2021). Human olfactory dysfunction: Causes and consequences. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03381-9>
- Schwob, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record*, 269(1), 33–49. <https://doi.org/10.1002/ar.10047>
- Sharma, A., Kumar, R., Aier, I., Semwal, R., Tyagi, P., & Varadwaj, P. (2019). Sense of Smell:

Structural, Functional, Mechanistic Advancements and Challenges in Human Olfactory Research. *Current Neuropharmacology*, 17(9), 891–911. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181206095626>

Shepherd, G. M., & Shepherd, G. M. (Eds.). (2004). *The Synaptic Organization of the Brain* (Fifth Edition, Fifth Edition). Oxford University Press. <https://academic.oup.com/book/25657>

Smith, R. L., Baker, H., Kolstad, K., Spencer, D. D., & Geer, C. A. (1991). Localization of tyrosine hydroxylase and olfactory marker protein immunoreactivities in the human and macaque olfactory bulb. *Brain Research*, 548(1), 140–148. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91115-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91115-H)

Smith, T. D., & Bhatnagar, K. P. (2019). Chapter 2—Anatomy of the olfactory system. In R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 164, pp. 17–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2>

Strotmann, J., & Breer, H. (2011). Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochemistry and Cell Biology*, 136(3), 357–369. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0850-y>

Suzukawa, K., Kondo, K., Kanaya, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Ushio, M., Kaga, K., & Yamasoba, T. (2011). Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(11), 2154–2174. <https://doi.org/10.1002/cne.22611>

Talamo, B. R., Rudel, R., Kosik, K. S., Lee, V. M.-Y., Neff, S., Adelman, L., & Kauer, J. S. (1989). Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature*, 337(6209), 736–739. <https://doi.org/10.1038/337736a0>

Tandler, B., Edelstein, D. R., & Erlandson, R. (2000). Ultrastructure of submucosal glands in human anterior middle nasal turbinates. *Journal of Anatomy*, 197(Pt 2), 229–237. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19720229.x>

Taniguchi, K., & Taniguchi, K. (2014). Phylogenic Studies on the Olfactory System in Vertebrates. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), 781–788. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0650>

The Nobel Prize. (2023). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2004. *NobelPrize.Org, Nobel Prize Outreach AB 2023*. <https://doi.org/https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2004/summary/>

- Treloar, H. B., Feinstein, P., Mombaerts, P., & Greer, C. A. (2002). Specificity of Glomerular Targeting by Olfactory Sensory Axons. *Journal of Neuroscience*, 22(7), 2469–2477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02469.2002>
- Trojanowski, J. Q., Newman, P. D., Hill, W. D., & Lee, V. M.-Y. (1991). Human olfactory epithelium in normal aging, alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders. *Journal of Comparative Neurology*, 310(3), 365–376. <https://doi.org/10.1002/cne.903100307>
- Tsuboi, Y., Wszolek, Z. K., Graff-Radford, N. R., Cookson, N., & Dickson, D. W. (2003). Tau pathology in the olfactory bulb correlates with Braak stage, Lewy body pathology and apolipoprotein epsilon4. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(5), 503–510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00453.x>
- Tzeng, W.-Y., Figarella, K., & Garaschuk, O. (2021). Olfactory impairment in men and mice related to aging and amyloid-induced pathology. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 473(5), 805–821. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02527-0>
- Uchida, S., Shimada, C., Sakuma, N., Kagitani, F., Kan, A., & Awata, S. (2020). The relationship between olfaction and cognitive function in the elderly. *The Journal of Physiological Sciences: JPS*, 70(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00777-8>
- Ueha, R., Shichino, S., Ueha, S., Kondo, K., Kikuta, S., Nishijima, H., Matsushima, K., & Yamasoba, T. (2018). Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 86. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00086>
- Valle-Leija, P. (2015). Odorant Receptors Signaling Instructs the Development and Plasticity of the Glomerular Map. *Neural Plasticity*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/975367>
- Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nuñez, J. M., Vossahl, L. B., & Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 79(6), 981–991. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90029-9)
- Vassar, R., Ngai, J., & Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74(2), 309–318. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90422-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90422-m)
- Vennemann, M. M., Hummel, T., & Berger, K. (2008). The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. *Journal of Neurology*, 255(8), 1121–1126. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0807-9>

- Wang, F., Wu, X., Gao, J., Li, Y., Zhu, Y., & Fang, Y. (2020). The relationship of olfactory function and clinical traits in major depressive disorder. *Behavioural Brain Research*, 386, 112594. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112594>
- Weiler, E., & Farbman, A. I. (1997). Proliferation in the Rat Olfactory Epithelium: Age-Dependent Changes. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3610–3622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03610.1997>
- Welge-Luessen, A., Hummel, T., Stojan, T., & Wolfensberger, M. (2005). What is the correlation between ratings and measures of olfactory function in patients with olfactory loss? *American Journal of Rhinology*, 19(6), 567–571. <https://doi.org/10.1177/19458924050190060>
- Witt, M., Bormann, K., Gudziol, V., Pehlke, K., Barth, K., Minovi, A., Hähner, A., Reichmann, H., & Hummel, T. (2009). Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 24(6), 906–914. <https://doi.org/10.1002/mds.22464>
- Wu, A., Yu, B., & Komiyama, T. (2020). Plasticity in olfactory bulb circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, 64, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.007>
- Xie, F., Fang, C., Schnittke, N., Schwob, J. E., & Ding, X. (2013). Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: Effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(3), 598–607. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.020>
- Xiong, W., & Chen, W. R. (2002). Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites. *Neuron*, 34(1), 115–126. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00628-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00628-1)
- Yahiaoui-Doktor, M., Luck, T., Riedel-Heller, S. G., Loeffler, M., Wirkner, K., & Engel, C. (2019). Olfactory function is associated with cognitive performance: Results from the population-based LIFE-Adult-Study. *Alzheimer's Research & Therapy*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0494-z>
- Zapiec, B., Dieriks, B. V., Tan, S., Faull, R. L. M., Mombaerts, P., & Curtis, M. A. (2017). A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction. *Brain*, 140(10), 2722–2736. <https://doi.org/10.1093/brain/awx208>
- Zapiec, B., & Mombaerts, P. (2015). Multiplex assessment of the positions of odorant receptor-specific glomeruli in the mouse olfactory bulb by serial two-photon tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), E5873–E5882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512135112>

Zhang, C., & Wang, X. (2017). Initiation of the age-related decline of odor identification in humans: A meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 40, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.004>

Zou, D.-J., Feinstein, P., Rivers, A. L., Mathews, G. A., Kim, A., Greer, C. A., Mombaerts, P., & Firestein, S. (2004). Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5679), 1976–1979. <https://doi.org/10.1126/science.1093468>

Zou, Y., Lu, D., Liu, L., Zhang, H., & Zhou, Y. (2016). Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 869–875. <https://doi.org/10.2147/NDT.S104886>

Anlage 1

Erklärung zur Eröffnung des Promotionsverfahrens Technische Universität Dresden – Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Prof. E. Holbrook, Prof. Dr. med. Th. Hummel
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters bzw. einer kommerziellen Promotionsberaterin in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: **Fitzek, M., Patel, P. K., Solomon, P. D., Lin, B., Hummel, T., Schwob, J. E., & Holbrook, E. H. (2022). Integrated age-related immunohistological changes occur in human olfactory epithelium and olfactory bulb. Journal of Comparative Neurology, 1–22.**
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.
9. Ich bin mit den an der Technischen Universität Dresden geltenden „Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens und für den Umgang mit Verstößen“ einverstanden.

Berlin, den 04.12.2023

Unterschrift des bzw. der Promovierenden

Anlage 2

Bestätigung über Einhaltung der aktuellen gesetzlichen Vorgaben

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation:

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: nicht zutreffend
- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung: nicht zutreffend
- die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
Projektnummer: nicht zutreffend
- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Berlin, den 04.12.2023

Unterschrift des bzw. der Promovierenden

Danksagung

Zuallererst gilt mein tiefster Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Hummel, sowie meinem Zweitbetreuer, Prof. Eric Holbrook, MD. Ihre hervorragende Betreuung, ihrer Leidenschaft für die Forschung und ihr fundiertes Wissen haben mir nicht nur einen kritischen Zugang zu der Thematik eröffnet, sondern nachhaltig meine wissenschaftliche Entwicklung geprägt. Besonders wertschätze ich das mir entgegengebrachte Vertrauen, meine Forschung selbstständig zu gestalten, und gleichzeitig die Sicherheit, die mir durch die unterstützende Leitung vermittelt wurde.

Ein besonderer Dank gebührt ebenso Prof. James Schwob, M.D., PhD, des Instituts Developmental, Molecular and Chemical Biology, der Tufts University School of Medicine, der mir die Möglichkeit eröffnete, einen Teil meiner wissenschaftlichen Arbeit in seinem Forschungsteam zu absolvieren. Der Aufenthalt an der Tufts University bot mir die Gelegenheit, in einer offenen Umgebung Erfahrungen in der experimentellen Forschung zu sammeln und mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich weiterzuentwickeln. Auch die Zusammenarbeit und den Austausch mit den PhD-Studierenden des Labors werde ich immer in guter Erinnerung behalten. Ihre Kritik, Fragen und Ideen halfen mir meine Arbeit im Verlauf immer wieder aus verschiedenen Blickwinkeln zu hinterfragen.

Mein großer Dank gilt auch den Zweitbegutachtern:innen, für ihre Zeit und Interesse sich eingehend mit meiner wissenschaftlichen Abhandlung zu beschäftigen.

Weiterhin möchte ich meinem Partner Paul danken, der unermüdlich die Höhen und Tiefen meiner Arbeit miterlebt und abgefangen hat. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, seine differenzierten Anmerkungen und vor allem sein moralischer Beistand haben mich maßgeblich während der Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation unterstützt.

Tief verbunden und dankbar bin ich außerdem meiner Schwester Joy, für ihre aufbauenden Gespräche und hilfreiche Unterstützung. Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich nicht nur inhaltlich, sondern auch emotional stets auf diesem aufregenden und herausfordernden Weg unterstützt haben und denen ich diese Arbeit widmen möchte.